

Aus dem Institut für Immunologie

Direktor: Prof. Dr. Stefan Bauer

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Aufnahmewege und biologische Aktivität von einzelsträngiger RNA
in Dendritische Zellen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Ann-Cathrin Graß

aus

Fritzlar

Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 25.06.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Stefan Bauer

Korreferent: Prof. Dr. Roland Lill

Meinen Eltern

Abkürzungen

Abb	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zelle
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
cDC	Konventionelle Dendritische Zellen
CpG	Deoxycytidylat-Phosphat-Deoxyguanylat
DMEM	Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelsträngig
DC	Dendritische Zelle
eGFP	Enhanced green fluorescent protein
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Fluoreszenz aktivierter Zellsorter
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flt3-Ligand	Fms-verwandter Tyrosinkinase-3-Ligand
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
H	Stunde
HRP	Horseradish peroxidase
IL	Interleukin
IRAK	IL-1 Rezeptor assoziierte Kinase
IRF	Interferon regulierender Faktor
KO	Knock out
L	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin rich repeats
M-CSF	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
Mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min	Minute
ml	Milliliter

mRNA	Messenger RNA
MyD88	Myeloider Differenzierungsmarker 88
neg	Negativ
ng	Nanogramm
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
ODN	Oligodesoxyribonukleotid
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
pDC	Plasmazytoide Dendritische Zellen
PE	Phycoerythin
PFA	Para-Formaldehyd
POX	Peroxidase
PRR	Pattern recognition receptor
PTO	Phosphorothioat
R-848	Resiquimod
RIG-I	Retinoic acid inducible gene I
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
Sec	Sekunde
Ss	Einzelsträngig
TICAM	TIR-containing-adaptor-molecule
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
TIRAP	TIR-domain containing adaptor protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAF-6	TNF-Rezeptor-assoziierter-Faktor 6
TRAM	TRIF-related-adaptor-molecule
TRIF	TIR-domain-containing-adaptor-inducing-IFN- β
U	Unit
wt	Wildtyp
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	7
1.1	Das Immunsystem.....	7
1.1.1	Angeborene Immunität	8
1.2	Chemische Transfektion und ausgewählte Reagenzien.....	16
1.2.1	Lipidvermittelte Transfektion	16
1.2.2	Polymervermittelte Transfektion	19
1.3	Ziel der Arbeit.....	21
2	MATERIAL UND METHODEN.....	22
2.1	Material	22
2.1.1	Geräte.....	22
2.1.2	Mäuse.....	23
2.1.3	Zellkultur	23
2.1.4	Antikörper	27
2.1.5	Transfektionsreagenzien	28
2.1.6	RNA	29
2.1.7	Medien für Stimulationsversuche	29
2.2	Methoden.....	30
2.2.1	Transfektion von primären Zellen und Zelllinien mit RNA.....	30
2.2.2	Mikroskopie	32
2.2.3	Durchflußzytometrie (FACS)	33
2.2.4	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	34
2.2.5	Isolierung von Zellen aus murinem Knochenmark	38
3	ERGEBNISSE.....	39
3.1	Charakterisierung von RNA40 durch Stimulation von TLR7-exprimierenden Zellen.....	39
3.1.1	Allgemeine Erläuterungen	39
3.1.2	FACS-Analyse	47
3.1.3	Mikroskopische Analyse.....	50
3.1.4	Transfektionsbedingungen und ihr Einfluss auf das Überleben der Zellen.....	54
4	DISKUSSION	61
4.1	Stimulation von TLR7 mit RNA40 und der Einfluss der verwendeten Transfektionsreagenzien.	61

5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	71
6	LITERATURVERZEICHNIS	73
7	DANKSAGUNG	79
8	ANHANG.....	80
8.1	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	80

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Der Begriff Immunsystem lässt sich zurückführen auf das lateinische Wort *immunis* („frei“, „verschont“, „unberührt“), dessen Bedeutung die Aufgaben im naturwissenschaftlichen Sinn erahnen lässt – der Schutz des Körpers vor schädigenden Einflüssen.

Der menschliche Organismus ist einer Vielzahl von Einflüssen ausgesetzt, die eine große Gefahr für die Gesundheit darstellen können, wenn sie nicht effektiv durch das Immunsystem bekämpft werden. Eine erste Hürde für Pathogene von außen stellen daher der Gastrointestinal- bzw. Respirationstrakt sowie die Haut dar. Sie bilden eine physikalische Barriere, die den Organismus nach außen schützen soll. Außerdem kann durch die Bildung von Sekreten durch diese Organe ein weiterer Schutz gewährleistet werden. Gelingt es pathogenen Bakterien, Viren, Parasiten oder anderen Krankheitserregern trotzdem in den Körper zu gelangen, werden weitere zelluläre Komponenten des Immunsystems aktiviert, die zum so genannten angeborenen Immunsystem gehören (siehe nächster Abschnitt). Die angeborene Immunität wurde früher auch als „unspezifisch“ bezeichnet. Dieser Begriff ist nicht mehr aktuell, da man heute auch sehr spezifische Reaktionen dieses Systems auf äußere Reize kennt.

Im weiteren Verlauf einer Infektion spielt auch die so genannte erworbene Immunität, oft ebenfalls als adaptives System bezeichnet, eine tragende Rolle. Ihre zellulären Bestandteile bestehen hauptsächlich aus B- und T-Zellen.

An dieser Stelle soll erwähnt werden, dass die angeborene und die erworbene Komponente des Immunsystems keinesfalls losgelöst voneinander existieren.

Unter anderem am Beispiel von HIV konnte gezeigt werden, dass Rezeptoren des angeborenen Systems einen Einfluss auf B-Zellen haben (Schlaepfer, Audige et al. 2006). Auch Mutationen innerhalb des Signalweges dieser Rezeptoren machen Verknüpfungen beider Systeme deutlich (Ku, von Bernuth et al. 2007).

1.1.1 Angeborene Immunität

Zu den Vertretern der angeborenen Immunität zählen Makrophagen, Dendritische Zellen und NK-Zellen sowie physikalische und chemische Barrieren, Komplementfaktoren, Chemokine und Zytokine. Anders als beim adaptiven System bildet sich nach einer einmaligen Infektion kein Gedächtnis aus. Dies ermöglicht eine unspezifische, sehr schnelle Reaktion innerhalb der ersten Minuten auf Pathogene, sodass eine folgende Erkrankung ausbleibt.

Das angeborene Immunsystem erkennt Strukturen, die in Pathogenen, nicht jedoch im Wirtsorganismus, vorkommen – so genannte *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs). Die Erkennung dieser Strukturen erfolgt durch die *pathogen related receptors* (PRR), durch die eine Immunreaktion eingeleitet werden kann.

Angeborene und erworbene Immunität verlaufen nicht völlig losgelöst voneinander. Spätestens wenn die „*first-line-defense*“ die Pathogene nicht erfolgreich eliminieren kann, tritt das adaptive Immunsystem in Kraft, um eine Erkrankung abzuwenden.

1.1.1.1 Toll-like Rezeptoren

Zu den PRR des angeborenen Immunsystems gehören 3 Gruppen von Rezeptoren: Das lösliche Mannose bindende Lektin sowie der membrangebundene Scavenger-Rezeptor, beide sind verantwortlich für die Ag-Aufnahme. Außerdem beinhalten sie die Gruppe der membrangebundenen Toll-like Rezeptoren, die zu einer Zellaktivierung nach Pathogen-Kontakt führen.

Der Begriff des „*Toll-like*“ Rezeptors basiert auf Entdeckungen, die bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* gemacht wurden. Diese besitzt den so genannten Toll-Rezeptor, der in der Embryogenese eine wichtige Rolle spielt (Hashimoto, Hudson et al. 1988). Fliegen, die durch genetische Defekte den Rezeptor nicht besitzen, zeigen außerdem eine erhöhte Anfälligkeit auf Pilzinfektionen (Lemaitre, Nicolas et al. 1996). So konnte hier eine Beziehung zwischen Toll und dieser Komponente des Immunsystems gefunden werden.

Die später auch in Säugetieren gefundenen Rezeptoren mit ähnlicher Funktion wurden daher Toll-like Rezeptoren genannt (Medzhitov and Janeway 1997). Der erste beschriebene Rezeptor dieser Familie ist der humane TLR4 (hTLR4) (Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997).

Bisher sind 11 Rezeptoren bekannt (Akira and Takeda 2004), die der Familie der TLR zugeordnet werden. Je nach Funktion und Lokalisation kann man diese wiederum in Untergruppen aufteilen.

So gehören TLR 3, 7, 8 und 9 zu den intrazellulären Rezeptoren, da sie sich in Endosom und Lysosom nachweisen lassen (Ahmad-Nejad, Hacker et al. 2002). TLR 1, 2, 4, 5 und 6 hingegen sind auf der Zelloberfläche lokalisiert.

Das Wirkspektrum der einzelnen TLR ist sehr breit gefächert: Es existieren Rezeptoren, die mehrere natürliche Liganden besitzen und somit vielseitig wirken können.

Tabelle 1

TLR	Ligand	Vorkommen	Referenz (Ligand/Vorkommen)
TLR1	<ul style="list-style-type: none"> • Lipopeptide von Bakterien und Mykobakterien 	<ul style="list-style-type: none"> • Makrophagen • cDC • Neutrophile • Mastzellen 	Akira 2006/ Iwasaki 2004, Takeda 2003
TLR2	<ul style="list-style-type: none"> • LTA von gram – neg. Bakterien • Zymosan • Lipopeptide (Pam3CSK4, MALP2) • Bestandteile von Mykobakterien 	<ul style="list-style-type: none"> • Makrophagen • cDC • Neutrophile • Mastzellen 	(Beutler, Jiang et al. 2006) (Akira, Uematsu et al. 2006) / (Iwasaki and Medzhitov 2004) (Takeda, Kaisho et al. 2003)
TLR3	<ul style="list-style-type: none"> • Virale dsRNA • poly(I:C) 	<ul style="list-style-type: none"> • cDC • Makrophagen • Endothelzellen 	(Akira, Uematsu et al. 2006) / (Iwasaki and Medzhitov 2004) (Sen and Sarkar 2005)
TLR4	<ul style="list-style-type: none"> • LPS von gram – neg. Bakterien • Mannan von Candida albicans • GPIs von Trypanosoma • Virale Hüllproteine 	<ul style="list-style-type: none"> • Makrophagen • cDC • Neutrophile • Mastzellen • Eosinophile 	(Akira, Uematsu et al. 2006), (Chow, Young et al. 1999) / (Iwasaki and Medzhitov 2004), (Takeda, Kaisho et al. 2003)

TLR5	<ul style="list-style-type: none"> • Flagellin 	<ul style="list-style-type: none"> • Monozyten • cDC 	(Akira, Uematsu et al. 2006), (Hayashi, Smith et al. 2001) / (Iwasaki and Medzhitov 2004), (Takeda, Kaisho et al. 2003)
TLR6	<ul style="list-style-type: none"> • Lipopeptide von Mykoplasmen • LTA von gram – pos. Bakterien 	<ul style="list-style-type: none"> • Monozyten • Mastzellen • cDC • Neutrophile 	(Akira, Uematsu et al. 2006) / (Iwasaki and Medzhitov 2004), (Takeda, Kaisho et al. 2003)
TLR7	<ul style="list-style-type: none"> • ssRNA von RNA – Viren • Imiquimod • Resiquimod (R848) • Synthetische polyU RNA 	<ul style="list-style-type: none"> • pDC • Neutrophile • Eosinophile 	(Kawai and Akira 2006), (Heil, Hemmi et al. 2004) / (Iwasaki and Medzhitov 2004)
TLR8	<ul style="list-style-type: none"> • Virale ssRNA • Resiquimod 	<ul style="list-style-type: none"> • Monozyten • Mastzellen • cDC • Neutrophile 	(Kawai and Akira 2006), (Heil, Hemmi et al. 2004) / (Iwasaki and Medzhitov 2004)
TLR9	<ul style="list-style-type: none"> • Bakterielle und virale CpG – Oligonukleotide 	<ul style="list-style-type: none"> • pDC • NK – Zellen • Eosinophile • Neutrophile 	(Akira, Uematsu et al. 2006) / (Iwasaki and Medzhitov 2004) Hemmi 2000
TLR10	-	<ul style="list-style-type: none"> • pDC • B – Zellen 	- / (Hasan, Chaffois et al. 2005)
TLR11	<ul style="list-style-type: none"> • Uropathogene Bakterien • Profilin – ähnliche Moleküle von Toxoplasma gondii 	<ul style="list-style-type: none"> • Makrophagen • Epithelzellen 	(Akira, Uematsu et al. 2006) / (Sen and Sarkar 2005)

Alle TLR gleichen sich in ihrer Kernstruktur und bestehen sowohl aus einer extrazellulären Domäne, die aus 18-24 *Leucin Rich Repeats* (LRR) aufgebaut ist, als auch aus einem intrazellulären Abschnitt, der von der *Toll/IL-1 Domäne* (TIR-Domäne) (Ishii, Coban et al. 2005) gebildet wird.

Aufgabe der LLR ist die direkte Erkennung von PAMPs (Kawai and Akira 2005), wodurch über die TIR-Domäne und weitere intrazelluläre Signalwege eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B stattfindet. Je nach Zellart werden nun unterschiedliche proinflammatorische Zytokine, wie TNF- α , Interferone oder Interleukine, gebildet.

1.1.1.1.1 Toll-like Rezeptor 7 (TLR7)

TLR 7, 8 und 9 wurden erstmals im Jahr 2000 beschrieben (Du, Poltorak et al. 2000). Wie bereits erwähnt, gehören sie zur Gruppe der intrazellulären Rezeptoren und befinden sich gemeinsam mit TLR3 im endosomal-lysosomalen Kompartiment.

Nicht nur wegen ihrer ähnlichen Lokalisation, sondern auch aufgrund ihrer Aminosäuresequenz, bilden diese Rezeptoren eine eigene Subpopulation der TLR.

Im Versuch mit TLR7 knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Zellen nach Stimulation mit dem synthetischen Stoff Resiquimod (R-848) keine Zytokine mehr produzieren. Dadurch wurde Resiquimod als TLR7-Ligand identifiziert. Diese Substanz ist schon seit einigen Jahren Bestandteil in der antiviralen und anti-tumoralen Therapie (Richwald 1999).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass einzelsträngige virale RNA (ssRNA) einen Stimulus für TLR7 darstellt (Heil, Hemmi et al. 2004) (Diebold, Kaisho et al. 2004). Hier ergibt sich die Frage, warum nicht auch körpereigene RNA von TLR7 erkannt wird und eine Immunreaktion auslöst. Die Antwort liefert die Betrachtung der unterschiedlichen Strukturen: Die virale RNA ist umgeben von einem Hüllprotein, von dem sie erst im Endosom befreit wird. Der Rezeptor kann nun die ssRNA erkennen und eine Reaktion einleiten. Die endogene ssRNA hingegen ist nackt und wird daher von RNasen abgebaut, bevor sie TLR7 im Zellinneren erreichen kann. Auch werden Schutzmechanismen in Form von bestimmten Methylierungsmustern diskutiert, die die RNA als „Selbst“ markieren (Ishii and Akira 2005).

Es hat sich gezeigt, dass endogene RNA, die bestimmte Nukleosid-Modifikationen wie m5C, m6A m5U oder Pseudouridine aufweist, einen geringeren immunstimulatorischen Effekt hat als RNA ohne diese Modifikationen. Sie scheinen daher dem Immunsystem als Marker zu dienen (Kariko, Buckstein et al. 2005).

1.1.1.1.2 Signalwege

Die Aktivierung der TLR führt in der Zelle zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B bzw. IRF-3. Je nach stimuliertem TLR werden nun bestimmte proinflammatorische Zytokine von der Zelle produziert.

Die Produktion von NF- κ B kann über zwei unterschiedliche Signalwege eingeleitet werden, zum einen mit, zum anderen ohne die Einbeziehung des Adaptermoleküls *Myeloid-Differentiation-Primary-Response-Gene 88* (MyD88).

Die beiden Signalwege sollen im Folgenden in Abhängigkeit ihrer Einbeziehung von MyD88 erläutert werden.

MyD88-abhängiger Signalweg

Nach Stimulation durch entsprechende Liganden von TLR 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, und 10 wird die Produktion von NF- κ B über MyD88 induziert.

Auch TLR4 induziert eine Immunantwort über diesen Weg, jedoch kann alternativ auch eine Signalkaskade über ein anderes Molekül stattfinden (siehe folgender Abschnitt), wodurch dieser Rezeptor eine Sonderstellung innerhalb der Rezeptorgruppe hat.

Bindet ein Ligand an den ihm zugehörigen TLR, so startet die Signalkaskade. Nach Stimulation von TLR 5, 7, 8 und 9 verläuft der Weg direkt über MyD88. MyD88 besitzt an seinem N-terminalen Ende eine death domain und an seinem C-terminalen Ende eine TIR-domain. Diese kommuniziert intrazellulär mit dem aktivierten TLR, wohingegen die death domain eine Rekrutierung des Moleküls *IL-1-Rezeptor-assoziierte-Kinase* (IRAK) vornimmt. IRAK selbst phosphoryliert *TNF-receptor associated factor 6* (TRAF) (Cao, Xiong et al. 1996), welcher nun im nächsten Schritt den *I κ B-Kinase-Komplex* (IKK-Komplex) aktiviert. I κ B wird dadurch phosphoryliert und kann sich von NF- κ B abwenden, an das es im dephosphorylierten Zustand bindet und es so inhibiert (Wang, Deng et al. 2001). NF- κ B ist nun frei und kann zum Zellkern wandern, wo es als Transkriptionsfaktor für die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen verantwortlich ist.

Im Fall der TLR 2 und 4 ist dem MyD88 ein weiteres Molekül, das so genannte *TIR-domain-containing-adaptor-molecule* (TIRAP), von einer anderen Gruppe auch als *MyD88-adaptor-like-protein* (MALP) bezeichnet, vorgeschaltet (Horng, Barton et al. 2001) (Fitzgerald, Palsson-McDermott et al. 2001). Dieser Adapter besitzt keine death domain, ist jedoch ein wichtiger Faktor für die Bildung von NF- κ B nach

Aktivierung von TLR 2 und 4. Abgesehen von TIRAP zu Beginn der Kaskade, verlaufen die Signale über die gleichen Wege wie im zuvor erläuterten Schema.

MyD88-unabhängiger Signalweg

TLR3 ist bisher der einzige Rezeptor der Toll-like Familie, der vollkommen unabhängig von MyD88 die Produktion von NF- κ B induzieren kann.

Jedoch muss auch hier erneut TLR4 erwähnt werden, der eine Sonderstellung auf Grund seiner Fähigkeit einnimmt, NF- κ B über beide Wege, d.h. abhängig und unabhängig von MyD88, zu induzieren. Gezeigt werden konnte das Phänomen der MyD88-Unabhängigkeit in MyD88-defizienten Mäusen. Nach Stimulation mit den entsprechenden Liganden dieser beiden Rezeptoren zeigte sich eine Induktion von NF- κ B, jedoch ohne Zytokinbildung (Kawai, Adachi et al. 1999). Des Weiteren erfolgte eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Interferon-regulatory-factor 3* (IRF-3) mit anschließender Produktion von IFN- β (Kawai, Takeuchi et al. 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass die Signalkaskade hier über die Adaptermoleküle *TIR-domain-containing-adaptor-inducing-IFN- β* / *TIR-containing-adaptor-molecul-1* (TRIF/TICAM-1) (Yamamoto, Sato et al. 2002) (Oshiumi, Matsumoto et al. 2003) verläuft.

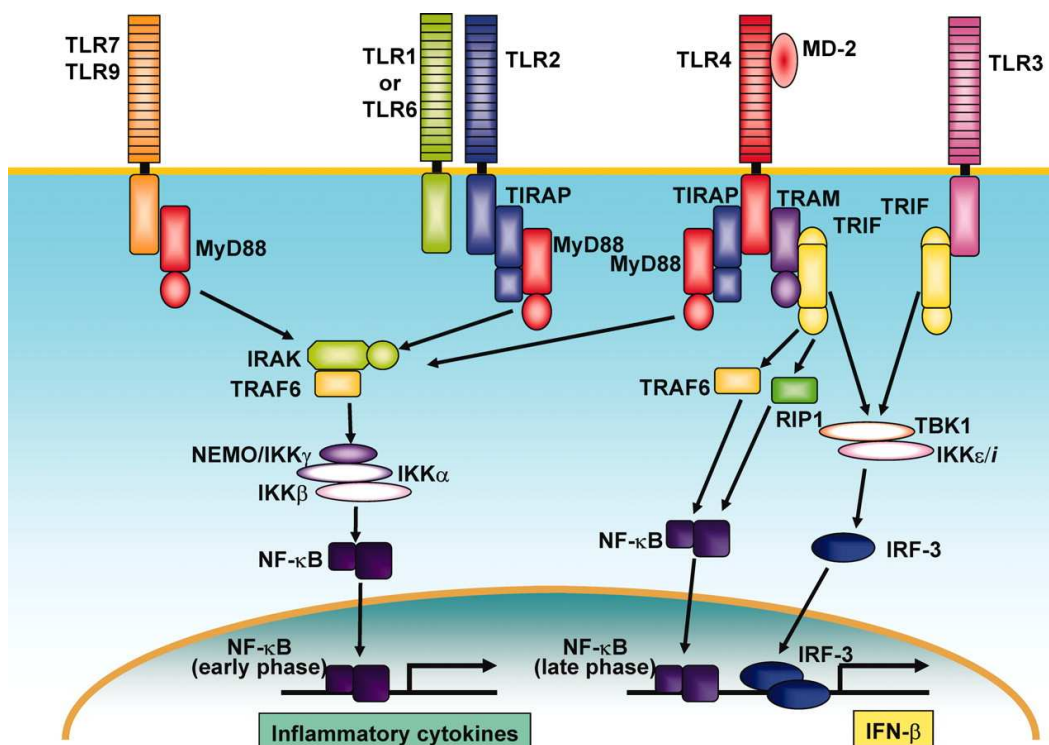


Abb.: 1.1

Signalwege der Toll-like Rezeptoren (Takeda 2005)

Wie Abbildung 1.1 zeigt, handelt es sich bei beiden Signalwegen um sehr komplexe Vorgänge, die noch viele Möglichkeiten zur weiteren Forschung bieten.

Sowohl das Wissen um den MyD88-abhängigen als auch den MyD88-unabhängigen Signalweg ist von enormer Bedeutung, speziell im Bezug auf spätere mögliche Therapieansätze.

1.1.1.2 Dendritische Zellen

Die *Dendritischen Zellen* (DCs) gehören zur Gruppe der *antigenpräsentierenden Zellen* (APC) und spielen eine wichtige Rolle in der frühen Phase der Immunabwehr.

Da DCs im humanen und murinen Blut nur einen kleinen Teil der Zellen ausmachen, war eine genaue Untersuchung lange Zeit sehr kompliziert. So beträgt die Subpopulation der *plasmazytoiden dendritischen Zellen* (pDCs) beispielsweise nur 0,1% im peripheren Blut. Mittlerweile ist es jedoch möglich, isolierte murine Knochenmarkzellen durch Zugabe bestimmter Wachstumsfaktoren (siehe Material und Methoden) zu DCs ausreifen zu lassen. So können die gewünschten Populationen gesondert *in vitro* züchten.

Man kann mehrere Arten von DCs unterscheiden bzw. die Zellen nach unterschiedlichen Kriterien betrachten.

So haben zum Beispiel unreife und reife DCs verschiedene Aufgaben. Während die unreifen DCs für die Toleranzinduktion und die Aufnahme von apoptotischen Materialien im peripheren Gewebe verantwortlich sind (O'Connor, Huang et al. 2000), tragen die reifen DCs zur Aktivierung der T-Zellen, dem so genannten Priming, bei.

Die Aufnahme von Fremdanitgenen durch unreife DCs findet hauptsächlich in der Haut sowie dem Gastrointestinal- und Respirationstrakt statt. Von hier gelangen die Zellen als reife DCs mit den typischen zytoplasmatischen Ausläufern in die drainierenden Lymphknoten und betreiben nun weniger Phagozytose, da sie sehr effizient die Antigene den naiven T-Zellen über MHCII-Komplexe präsentieren, die dadurch unter Mithilfe von Zytokinen aktiviert werden und sich zu Effektor-T-Zellen weiterentwickeln. Dieses kann über IL-12 zur Produktion von *CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen* (T_H1 -Zellen) führen oder über die Ausschüttung von IL-4 die Produktion von *CD4⁺ T-Helferzellen* (T_H2 -Zellen) fördern. Welcher Typ der T-Zellen vermehrt gebildet wird, richtet sich nach dem Antigen, da bestimmte Antigene unterschiedliche TLR stimulieren. Außerdem hängt die T-Zell Entwicklung von der so genannten Subpopulation der DCs ab: je nach Stimulation der DC-Untergruppe resultiert ein

spezifisches Zytokinmuster. Die DC-Subpopulationen mit ihren Funktionen sollen im Folgenden näher erläutert werden.

Man unterscheidet 2 Hauptgruppen der humanen DCs: Die dendritischen Zellen der myeloiden (myeloide dendritische Zellen "mDC") und die dendritischen Zellen der lymphatischen Entwicklungslinie (plasmazytoide dendritische Zellen „pDC“).

Die pDCs sind charakteristischer Weise Zellen, die über TLR7 und TLR9 verfügen. Dieses lässt erahnen, dass es sich um spezialisierte Zellen der viralen Abwehr handelt. Doch auch in Autoimmunphänomenen und Tumorerkrankungen sind sie von Bedeutung. Anders als andere Zellen der Körperabwehr sind sie in der Lage, enorme Mengen an IFN- α zu produzieren und so eine inflammatorische Reaktion zu induzieren. Sie kennzeichnen sich ganz besonders aus durch CD4, CD45RA und CD123 auf ihrer Oberfläche.

Wichtige Strukturen auf der Oberfläche der *mDCs* hingegen sind CD11c, CD33 und viel MHCII, die typischen Zytokine sind hier TNF- α und IL-12.

Diese gewebständigen Zellen kommen in nahezu allen menschlichen Organen vor.

1.2 Chemische Transfektion und ausgewählte Reagenzien

Die Aufnahme von Oligonukleotiden in Zellen ist ein wichtiger Bestandteil vieler unterschiedlicher Forschungsansätze. Diese so genannte Transfektion von Zellen ist ein sehr komplexes Thema. Die Bedingungen *in vivo* und *in vitro* sind sehr unterschiedlich, sodass die *in vitro* erarbeiteten Ergebnisse nicht problemlos auf die Situation *in vivo* angewendet können (Audouy and Hoekstra 2001).

Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten, die Transfektion der Zellen durchzuführen. Hierzu zählen zum Beispiel die Calciumphosphat-Präzipitation (Graham and van der Eb 1973), die Elektroporation (Chu, Hayakawa et al. 1987) oder die Mikroinjektion von DNA direkt in den Zellkern (Capecchi 1980). Zu den chemischen Varianten der Transfektion werden die lipid- und polymervermittelten Transfektionsarten gezählt. Letztere sind Gegenstand dieser Arbeit und werden daher im Folgenden näher erläutert. Zusätzlich werden ausgewählte Reagenzien der beiden Transfektionsarten genauer dargestellt.

1.2.1 Lipidvermittelte Transfektion

Das in den 80er Jahren erstmal hergestellte kationische Lipid DOTMA (Felgner, Gadek et al. 1987) bildet die Basis für weitere synthetisch hergestellte Stoffe, die der Transfektion von Zellen mit unterschiedlichsten Stoffen dienen. Diese so genannten Liposomen sind zum heutigen Zeitpunkt schon wichtiger Bestandteil der anti-tumoralen Therapie, so werden sie zum Beispiel in der Therapie des Brustkrebses genutzt: Durch Kopplung von Anthrazyklinen an Liposomen können die Nebenwirkungen der Chemotherapie wesentlich verringert werden – was einen großen Vorteil im Umgang mit den primär toxischen Substanzen darstellt (Lorusso, Manzione et al. 2007).

Gemeinsam mit Oligonukleotiden bilden sie so genannte Lipokomplexe.

Kationische Lipide haben einen charakteristischen Aufbau, der sich aus unterschiedlichen Komponenten (Gao and Huang 1995) zusammensetzt.

Zuerst sei hier der *positiv geladene Kopf* genannt. An diesen Teil des Lipids bindet das Oligonukleotid, er ist folglich verantwortlich für die Ausbildung des so genannten Lipokomplexes. Außerdem tritt der Komplex an dieser Stelle in Wechselwirkung mit der Zellmembran. Es kann unterschieden werden zwischen einer monovalenten und

einer multivalenten Ladung, wobei letztere Variante für einen kompakteren Lipokomplex mit höherer Transfektionseffizienz sorgt.

Des Weiteren gibt es den *Verbindungsteil (Spacer)*. Dieser Abschnitt des Lipids ist für die chemische Stabilität und die Bioabbaubarkeit verantwortlich. Je nachdem, welche Bindungen in diesem Bereich vorliegen, ist das Liposom stabil oder weniger stabil. Dieses hat einen direkten Einfluss auf den Abbau und die Verweildauer in der Zelle und kann somit wichtig sein für eventuell auftretende toxische Reaktionen.

Beispiele für Bindungsvarianten in diesem Abschnitt sind Ether-/C-N-Brücken, die sich durch hohe Stabilität auszeichnen, daher aber auch schwer abbaubar sind und Probleme hervorrufen können durch ihre Toxizität bei in *vivo* Gebrauch.

Außerdem kann die Bindung in Form von Esterbrücken vorliegen. Diese sind weniger toxisch, jedoch auch schneller abbaubar (Farhood, Bottega et al. 1992).

Den letzten Abschnitt bildet der so genannte *hydrophobe Anker*.

Dieser wasserabweisende Teil ist für die Membranfluidität und die Ausbildung von Bilayern verantwortlich (Ito, Miyazoe et al. 1990) (Felgner, Kumar et al. 1994).

Er kann entweder aus zwei aliphatischen Ketten oder einem Cholesterolgerüst bestehen.

Die kationischen Lipide können Liposomen bilden. Diese definieren sich als kleine Vesikel mit einem Durchmesser von 20 nm bis 3 µm, die aus einer oder mehreren Phospholipiddoppelschichten bestehen. In ihrem Inneren beherbergen sie einen wässrigen Kern.

Die kationischen Lipide können in ihrer Funktionalität von so genannten Helferlipiden unterstützt werden. Hierbei handelt es sich um neutrale Lipide, die die Toxizität von Lipoplexen verringern und Einfluss auf die Membranstabilität nehmen sollen.

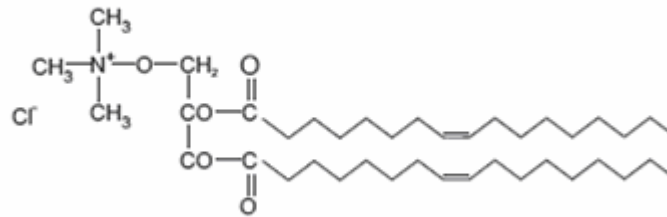
In den von uns durchgeführten Versuchen wurden folgende Reagenzien zur lipidvermittelten Transfektion eingesetzt:

DOTAP:

N-(1-(2, 3-Dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium methylsulfat

(DOTAP)

DOTAP



Lipofectin:

Es handelt sich um eine 1:1 (w/w) Rezeptur aus dem kationischen Lipid N-(1-(2, 3-Dioleoyloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium chlorid (**DOTMA**) und dem neutralen Lipid dioleoyl phosphatidylethanolamin (**DOPE**)

Lipofectamine:

Es handelt sich um eine 3:1 (w/w) Rezeptur aus dem polykationischen Lipid 2, 3-dioleoyloxy-N-(2(sperminecarboxamido)ethyl)-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetat (**DOSPA**) und dem neutralen Lipid dioleoyl phosphatidylethanolamin (**DOPE**)

Lipofectamine2000:

Keine näheren Angaben zur Zusammensetzung durch den Hersteller

Dharmafect:

Keine näheren Angaben zur Zusammensetzung durch den Hersteller

Gene Porter:

Es handelt sich um eine 1:1 Rezeptur aus dem neutralen Lipid dioleoyl phosphotidylethanolamin (**DOPE**) und einem geschützten kationischen Lipid, das mittels eines patentierten Verfahrens, der direkten hydrophilen Konjugationstechnologie (DHC), hergestellt wurde.

1.2.2 Polymervermittelte Transfektion

Hierbei handelt es sich um einen nichtlipidvermittelten Transfer von Oligonukleotiden in das Zellinnere. Die Substanzen sind polykationisch und wasserlöslich und bilden gemeinsam mit DNA/RNA so genannte Polyplexe. Dieser Vorgang wird als Polyfektion bezeichnet. Es gibt einige Untergruppen, wie zum Beispiel Polyethylemin (PEI), Poly-Lysin (PLL), Polybren, Dimethylaminoethylmethacrylat (DMAEMA) oder Diethylaminoethyl-Dextran (DEAE-Dextran). Da in den später gezeigten Versuchen nur die Dendrimere (Haensler and Szoka 1993) (Lee and Huang 1996) (Tang, Redemann et al. 1996) verwendet wurden, soll ausschließlich auf diese näher eingegangen werden. Charakteristisch für Dendrimere ist ihre verzweigte, baumartige Form (gr. Dendros – der Baum). Genau wie die Lipokomplexe werden sie mittels Endozytose in die Zellen aufgenommen.

Es gibt einige Dendrimere, die experimentell eingesetzt werden. Jedoch haben sie auch schon Anwendung in *in vivo* Studien gefunden (Maruyama-Tabata, Harada et al. 2000).

In den von uns durchgeführten Versuchen wurden folgende Reagenzien zur polymervermittelten Transfektion eingesetzt:

Superfect/Polyfect:

Sie bestehen aus aktivierten Dendrimer-Molekülen und haben die typische sphärische Struktur. Vom Zentrum ausgehend enden sie in Aminogruppen, an denen nun die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren binden können. Die Aufnahme erfolgt dann über Endozytose.

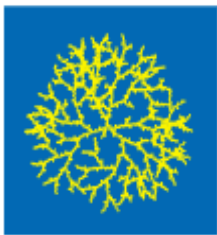


Abb.: 1.2

Typische sphärische Form von Superfect und Polyfect

Exemplarisch wurden die wichtigsten Transfektionsreagenzien vorgestellt. Es wurden in den unterschiedlichen Versuchen auch andere Reagenzien getestet, auf die jedoch an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden soll.

Der einleitende Teil dieser Arbeit hat die wichtigsten Komponenten der Versuche erläutert. Besonders relevant für die folgenden Versuche ist die RNA40, bei der es sich um einen GU-reichen, einzelsträngigen TLR7-Liganden handelt. Des Weiteren sind die TLR7- exprimierenden DCs und die unterschiedlichen Transfektionsreagenzien von Bedeutung. Im anschließenden Absatz sollen die Zusammenhänge zwischen diesen Faktoren und die Zielsetzung der Arbeit angesprochen werden.

1.3 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, die Funktion von einzelsträngiger RNA40 im Bezug auf den endosomalen Toll- like-Rezeptor 7 unter Zuhilfenahme von Transfektionsreagenzien zu analysieren. Es wurde untersucht, wie sich die RNA nach Endozytose durch die Zelle verhält und wo sie intrazellulär lokalisiert ist. Zur näheren Betrachtung wurden unterschiedliche Transfektionsreagenzien genutzt, um deren möglichen Einfluss auf die Stimulation mit RNA40 zu überprüfen. Auf diese Weise sollte gegebenenfalls eine TLR7-(Un-) Abhängigkeit festgestellt werden – sowohl von dem Transfektionsreagenz als auch von der RNA.

Die Versuche wurden in unterschiedlichen Zelltypen durchgeführt, um deren Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede bezüglich des Rezeptors festzustellen. Auch sollten die Unterschiede in der Aktivierung von TLR7 zwischen murinem und humanem System dargestellt werden, weshalb auch die Isolation von PBMC aus Spenderblut eine der gewählten Methoden darstellt.

Die Auswertung der Versuche fand im Wesentlichen durch die Bestimmung der zellulären Zytokinproduktion im IFN- α ELISA statt. Des Weiteren konnte die Qualität der RNA-Aufnahme in die Zelle im FACS getestet und eine genauere Charakterisierung ihrer Lokalisation unter Zuhilfenahme von Auflicht- bzw. Durchlichtmikroskopie vorgenommen werden.

In Stichworten ist das Hauptanliegen dieser Arbeit folglich

1. Stimulierbarkeit von TLR7 durch RNA40
2. Charakterisierung von RNA40 nach Aufnahme in die Zelle
3. Einfluss von Transfektionsreagenzien und Stimulationsbedingungen auf die Immunaktivierung von RNA40
4. Unterschiede in der Aktivierbarkeit von TLR7 im humanen und murinen System

Auch wenn viele Merkmale von TLR7 zum heutigen Tage schon bekannt sind, so fehlen doch zahlreiche Informationen, um das Bild zu vervollständigen.

Bisher ließ sich beispielsweise bereits eine Verbindung von TLR7 zu einer Autoimmunerkrankung, dem systemischen Lupus erythematoses, herstellen. Das Verständnis der Wirkungsmechanismen des Rezeptors kann also ein wichtiger Baustein in zukünftigen Therapieansätzen dieser und evt. weiterer Erkrankungen sein.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 2

Gerät	Hersteller
ELISA – Reader <i>SoftMax Pro 5</i>	Molecular Devices, Ismaning, Deutschland
ELISA – Washer <i>Skan Washer</i>	Molecular Devices, Ismaning, Deutschland
Durchflußzytometer <i>FACCalibur</i>	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Mikroskop <i>Axiovert 40 + ApoTome</i>	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Brutschrank <i>Hera cell 240</i>	Thermo Electron Corporation, Osterode, Deutschland
Sterilbank <i>Hera safe</i>	Thermo Electron Corporation, Osterode, Deutschland
Zentrifuge <i>Multifuge 1 L-R</i>	Thermo Electron Corporation, Osterode, Deutschland
Zentrifuge <i>Biofuge 15</i>	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
Mikroskop <i>Leica DMRB</i>	Leica Microsystems, Bensheim, Deutschland
Pipetboy, <i>acu</i>	IBS Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland

2.1.2 Mäuse

In den unterschiedlichen Versuchen wurden C57BL/6-Mäuse (wt) und TLR7ko-Mäuse eingesetzt. Die C57BL/6-Mäuse stammen von Harlan, Borchern.

Die TLR7ko-Mäuse (Hemmi, Kaisho et al. 2002) wurden von S.Akira generiert und zur Verfügung gestellt. Die Tiere werden im BMFZ unter special pathogen free (SPF) Bedingungen gehalten.

2.1.3 Zellkultur

2.1.3.1 Zellen

RAW264.7

Die murine Maus-Makrophagenphagenlinie RAW264.7 wurde in RPMI complete Medium in 10cm Petrischalen kultiviert.

Flt3-Ligand Kultur

Murine Knochenmarkzellen wurden in einer Konzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml in RPMI complete Medium aufgenommen und für 8 Tage in 10ml Kulturflaschen kultiviert. An Tag 0 erfolgte die Zugabe von 35ng/ml Flt3-Ligand.

GM-CSF Kultur

Murine Knochenmarkzellen wurden in einer Konzentration von $0,3 \times 10^6$ Zellen/ml in RPMI complete Medium aufgenommen und für 8 Tage in 10ml Kulturflaschen kultiviert. An Tag 0 erfolgte die Zugabe von 0,01µg/ml GM-CSF.

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

Aus einem humanen Lymphozytenkonzentrat wurden die mononukleären Zellen isoliert, sodass eine Zellpopulation aus Monozyten und Lymphozyten gewonnen werden konnte.

Die Zellen wurden in einer Konzentration von 3×10^6 Zellen/ml RPMI aufgenommen und mit 4% AB-Serum versetzt. Die Endkonzentration des AB-Serums betrug somit nach Stimulation 2%, da zu einem Zellsuspensionsvolumen von 100µl eine identische Menge der Stimulationsverdünnung hinzugefügt wurde.

2.1.3.2 Liganden für die Zellkultur

Fms-like tyrosine kinase 3 Ligand (Flt3-Ligand)

Die Funktion des Liganden ist die Stimulation des Flt3-tyrosine Kinase-Rezeptors. Dieser Rezeptor wird in einer Vielzahl von humanen und murinen Zellen exprimiert und führt nach seiner Aktivierung zur Bildung von dendritischen Zellen. Bezugsquelle des Liganden ist WEHI Melbourne, Australien.

Granulocyte-monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF)

GM-CSF gehört zu einer Gruppe von haematopoetischen Zytokinen. Gebildet wird dieser Faktor von Endothelzellen, Fibroblasten, Monozyten und T-Lymphozyten um daraufhin die Differenzierung von Vorläuferzellen in Neutrophile, Eosinophile und Monozyten zu stimulieren. GM-CSF wurde produziert von R&D Systems.

Monozyte colony – stimulating factor (M-CSF)

M-CSF wird produziert von Makrophagen, Endothelzellen, Knochenmarkzellen und Fibroblasten. Aufgabe von M-CSF ist die Bildung von Monozyten aus Knochenmarkzellen. M-CSF wurde erworben bei R&D Systems.

2.1.3.3 Weiterer Umgang mit kultivierten Zellen

Abnehmen der primären Mauszellen von den Kulturschalen:

Die Knochenmarkszellen, die mit Hilfe von Flt3-Ligand und GM-CSF generiert wurden, konnten an Tag 8 vorsichtig aus den Kulturflaschen abgenommen werden. Unter Zuhilfenahme von Zellschabern wurden die adhärennten Zellen gelöst und in 50ml Blue Caps überführt. Nach einem Waschschrift erfolgten das Auszählen der Zellen und die Einstellung auf die gewünschte Konzentration für die Stimulation.

Passagieren und Abnehmen von RAW-Makrophagen:

Die RAW-Makrophagen wurden jeden 3. Tag im Verhältnis 1:10 gesplittet. Durch mehrfaches auf- und abpipettieren mit dem Pipetboy ließen sich die Zellen gut von der Petrischale lösen. Nach einem Waschschrift wurden sie entweder im oben genannten Verhältnis geteilt oder direkt für eine Stimulation eingesetzt.

2.1.3.4 Zählen der Zellen

Sämtliche Zellen wurden nach einem einheitlichen Verfahren gezählt.

Ein definiertes Volumen an Zellen wurde mit einem definierten Volumen Eosin gemischt und auf einen Objektträger mit Neubauer-Zählkammer aufgetragen.

Mit Hilfe von Eosin sollen tote Zellen sichtbar gemacht werden, da diese rot angefärbt werden.

Formel:

Zellzahl/ml = gezählte Zellen im Zählquadrat x Verdünnungsfaktor x 10

2.1.3.5 Medien für die Zellkultur

Tabelle 3

	RPMI complete	RPMI	DMEM complete
FCS	10 %	-	10 %
Penicillin/ Streptomycin	5 %	5 %	5 %
Glutamin	5 %	5 %	5 %
β - Mercaptoethanol	0,356 %	0,356 %	0,356 %

RPMI und DMEM wurden erworben bei PAA, Cölbe, Germany

2.1.3.6 In der Zellkultur verwendetes Plastik

Tabelle 4

Material	Hersteller
Kulturflaschen 175cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber <i>BD Falcon Cell scraper</i>	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
50ml Conical Polypropylene tubes	Greiner bio – one, Solingen, Deutschland
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
6 well Platten	Greiner bio – one, Solingen, Deutschland
96 well Platten	Greiner bio – one, Solingen, Deutschland

2.1.4 Antikörper

murine Zytokinauswertungen

Tabelle 5

mIFN-α ELISA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>Capture-Antikörper:</u> Monoclonal antibody against mouse interferon-α, <i>Biomedical Laboratories, 22100-1</i> ▪ <u>Standard:</u> Recombinant mouse alpha interferon (CHO-derived), <i>HyCult biotechnology b.v., HC1040a</i> ▪ <u>Detektionsantikörper:</u> Rabbit polyclonal antibody against mouse interferon alpha, <i>Biomedical Laboratories, 32100-1</i> ▪ <u>Enzym:</u> Peroxidase-conjugated AffiniPure (ab')₂ Fragment Donkey Anti-rabbit IgG <i>Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., 711-036-152</i> ▪ <u>OPD:</u> O-Phenylenediamine dihydrochloride tablet <i>Sigma Aldrich, P5412</i>
mIL-6 ELISA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <u>Capture – Antikörper:</u> Biotinylated rat anti-mouse IL-6 monoclonal antibody, <i>BD Biosciences Pharmingen, 554400</i> ▪ <u>Standard:</u> IL-6, recombinant mouse, <i>BD Biosciences Pharmingen, 554582</i> ▪ <u>Detektionsantikörper:</u> Purified rat anti-mouse IL-6 monoclonal antibody, <i>BD Biosciences Pharmingen, 554402</i> ▪ <u>Enzym:</u> Streptavidin-POX ▪ <u>OPD:</u> O-Phenylenediamine dihydrochloride tablet <i>Sigma Aldrich, P5412</i>

humane Zytokinauswertungen

Tabelle 6

huIFN- α ELISA	IFN-α Module Set, <i>Bender MedSystems, BMS216MST</i>
---------------------------	---

2.1.5 Transfektionsreagenzien

Tabelle 7

Transfektionsreagenz	Hersteller
DOTAP	<i>ROCHE, Grenzach-Wyhlen, Deutschland</i>
Lipofectamin2000	<i>Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland</i>
Lipofectamin	<i>Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland</i>
Lipofectin	<i>Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland</i>
GenePorter	<i>Genlantis, San Diego, USA</i>
Dharmafect1	<i>Dharmacon, Chicago, USA</i>
Dharmafect2	<i>Dharmacon, Chicago, USA</i>
Dharmafect3	<i>Dharmacon, Chicago, USA</i>
Dharmafect4	<i>Dharmacon, Chicago, USA</i>
HiPerFect	<i>Qiagen, Hilden, Deutschland</i>
Polyfect	<i>Qiagen, Hilden, Deutschland</i>
Superfect	<i>Qiagen, Hilden, Deutschland</i>

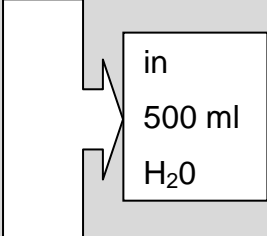

2.1.6 RNA

Die RNA stammte von *IBA Nucleic Acids Synthesis, Göttingen*:

RNA40	5' - GCC CGU CUG UUG UGU GAC UC - 3' nicht modifiziert
RNA40 – Alexa488	5' - GCC CGU CUG UUG UGU GAC UC - 3' am 3`Ende modifiziert mit Alexa 488
RNA40 – Alexa546	5' - GCC CGU CUG UUG UGU GAC UC - 3' am 3`Ende modifiziert mit Alexa 546

2.1.7 Medien für Stimulationsversuche

Tabelle 8

Medium	Inhalt/Herkunft
OptiMEM I Reduced Serum Medium (Stimulationsmedium)	GIBO™ invitrogen corporation
Liposomenpuffer (Stimulationsmedium)	<div> <div> 2,4 g 20 mM HEPES 4,4 g 150mM NaCl pH 7,4 3 h rühren 2x autoklavieren </div> <div>  </div> </div>
FACS-Puffer	<div> 3 % FCS 0,01 % Azid </div> <div>  </div>

2.2 Methoden

2.2.1 Transfektion von primären Zellen und Zelllinien mit RNA

Allgemeines Prinzip:

Es existieren verschiedene Verfahren, um Nukleinsäuren von außen in Zellen zu überführen. Man kann zwischen *stabiler* und *transienter Transfektion* unterscheiden. Bei der *stabilen Transfektion* findet der Einbau einer fremden Nukleinsäure in das Genom der Wirtszelle statt. Die neue Erbinformation ist somit dauerhaft in die Zelle integriert und wird im Zuge der Zellteilung entsprechend vermehrt.

Bei der *transienten Transfektion* wird ebenfalls DNA oder RNA in die Zelle eingebracht. Hier verweilt sie jedoch nur für einen begrenzten Zeitraum, bevor sie dann von zelleigenen Systemen wieder abgebaut wird.

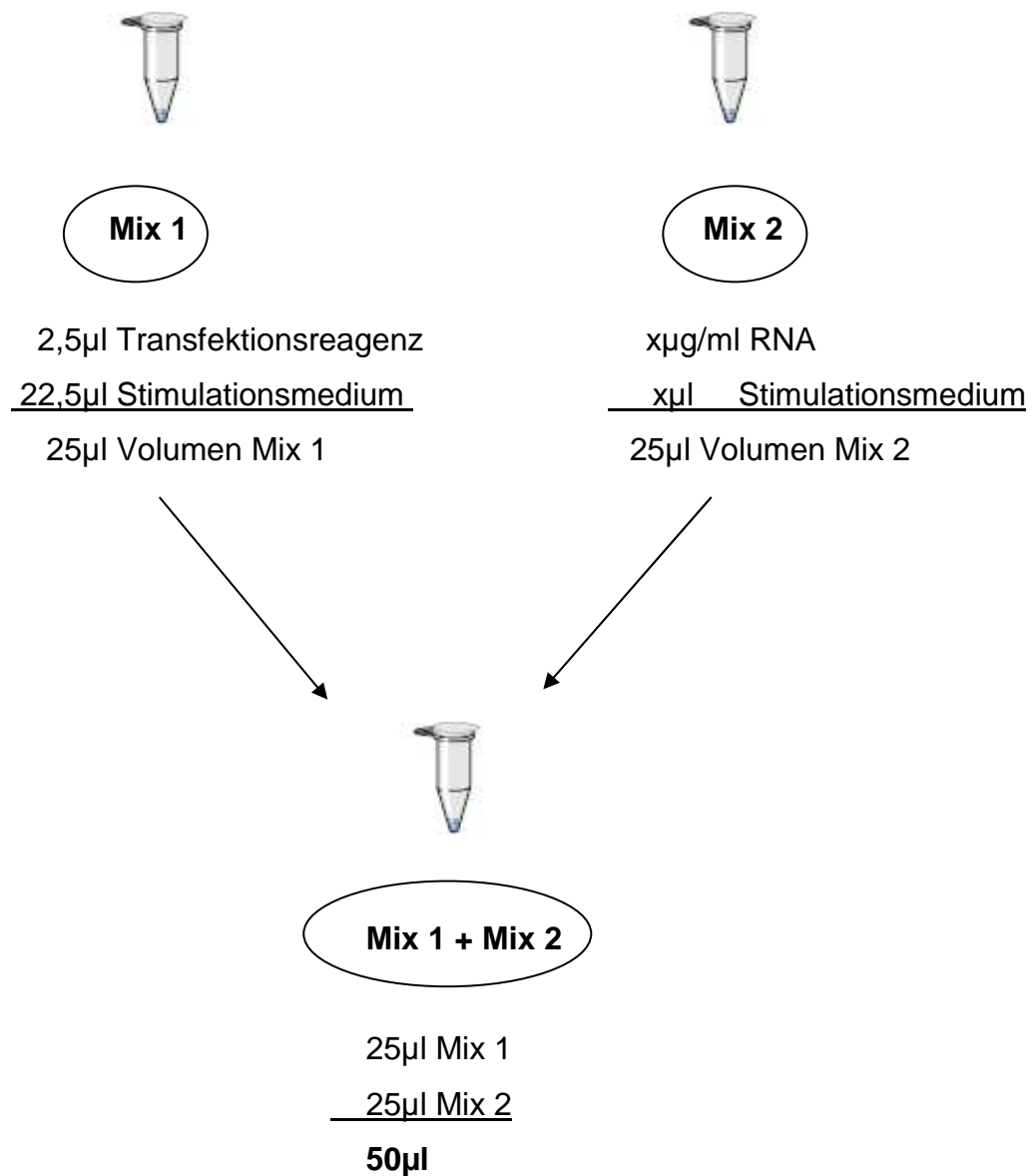
Für beide Arten der Transfektion können verschiedene Methoden angewandt werden, wobei die Effizienz stets abhängig ist von vielen Faktoren. So muss eine optimale Kombination aus Zelltyp, Transfektionsmethode und Nukleinsäure gewählt werden, um ein Maximum an eingebrachter Nukleinsäure zu erreichen.

Transiente Transfektion:

Die in dieser Arbeit vorgelegten Versuche wurden in ihrer Gesamtheit mittels Lipofektion bzw. Polyfektion durchgeführt. Diese Verfahren gehören zur Gruppe der transienten Transfektion.

Unter Lipofektion versteht man die Verbindung einer Nukleinsäure mit einem Liposom. Durch diesen Komplexierungsvorgang kann es nun gelingen, die Nukleinsäure in die Zelle einzuschleusen. Entsprechendes gilt für die Polyfektion, bei der Nukleinsäure und Transfektionsreagenz einen Polyplex bilden.

Um die Zytokinantwort von Makrophagen, pDCs, DCs und PBMC in den später gezeigten Experimenten zu bestimmen, wurde der folgende Stimulationsansatz erstellt (das hier angegeben Endvolumen von 100µl entspricht der Menge, die für die Stimulation eines Wells in einer 96er Platte benötigt wird):

**Abb.: 2.1**

Transfektionsschema

Der Ansatz aus 50µl wurde nun für 15min bei RT inkubiert und anschliessend mit der identischen Menge (50µl) Transfektionsmedium versetzt.

Das resultierende Volumen von 100µl wurde auf 100µl Zellsuspension im 96er well aufgetragen und für 24h im Brutschrank inkubiert.

Stimulation mit nicht-markierter RNA

Die Stimulation entsprach dem oben gezeigten Schema.

In Mix 1 wurde die gewünschte Konzentration von RNA in einem Volumen von 25µl im Stimulationsmedium angesetzt. Mix 2 enthielt die angegebenen Mengen an Stimulationsmedium und Transfektionsreagenz. Beide Ansätze wurden miteinander vereint und in dem daraus resultierenden Volumen von 50µl für 10-15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation wurde das Gesamtvolumen durch Zugabe von 50µl Stimulationsmedium auf 100µl verdoppelt und auf die Zellen aufgetragen.

Der hier erläuterte Ansatz von 100µl entspricht der Menge, die für eine Stimulation von 2×10^5 Zellen benötigt wurde. Diese Zellmenge befand sich in einem 96er well in 100µl RPMI complete/RPMI.

Stimulation mit markierter RNA

Der Ablauf der Stimulation entsprach dem Verfahren mit nicht-markierter RNA.

In den Versuchen mit markierter RNA wurde RNA40 in Kombination mit den entsprechenden markierten Gegenständen RNA40-markiert verwendet. Das Verhältnis von RNA40/RNA40-markiert betrug hierbei 10:1.

2.2.2 Mikroskopie

Allgemeines Prinzip:

Um das Verhalten der Transfektionsreagenzien innerhalb der Zelle beurteilen zu können, wurde die herkömmliche RNA40 mit einem fluoreszenzmarkierten Gegenstück kombiniert und nach der Stimulation mit unterschiedlichen Reagenzien unter einem Auflichtmikroskop (Zeiss, Axiovert40) in Kombination mit einer Vorrichtung für Fluoreszenzmikroskopie (Zeiss, Apotome) betrachtet.

Die Fluochrome können mittels eines Lichtstrahls der entsprechenden Wellenlänge angeregt werden, wodurch die transfizierten Zellen sichtbar werden.

Absorption und Emission der verwendeten Fluochrome:

Alexa 488	495 nm / 519 nm	→	fluoresziert grün
Alexa 546	556 nm / 572 nm	→	fluoresziert rot

Vorbereitung der Mikroskopie:

Die Stimulation erfolgte in einem 6well, in dem 3×10^6 Zellen/ml in einem Volumen von 500µl RPMI complete vorgelegt waren. Die Stimulation folgte der schematisch erläuterten Vorgehensweise.

Die Zellen wurden 1 Stunde nach der Stimulation gewaschen und für weitere 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgten 2 Waschschrte mit PBS def. und die Aufnahme in 200µl 3%iges PFA. Durch die Zentrifugation in einem Zytospin für 5 min bei 500rpm wurden die Zellen auf dem Objektträger fixiert.

Für die Arbeit am Computer erwies sich Axioversion (Zeiss) als geeignete Software.

2.2.3 Durchflußzytometrie (FACS)

Allgemeines Prinzip:

Um die Aufnahme der RNA40 in unterschiedlichen Zellen zu überprüfen, wurde ein Durchflußzytometer (Becton Dickinson) verwendet.

Die Zellen werden fluoreszenzmarkiert im Durchflusszytometer einzeln aufgereiht durch einen Laserstrahl transportiert, welcher sie zur Eigenfluoreszenz anregt. Die Fluoreszenz und das Streulicht können nun vom Computer ausgewertet werden, sodass die Zellen nun nach unterschiedlichen Charakteristika betrachten und analysiert werden können.

Vorbereitung der FACS-Analyse:

Hierfür wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 /ml in RPMI complete ausgesät. Die Stimulation erfolgte nach dem oben genannten Schema mit der entsprechenden Menge an RNA40/RNA40-markiert, Transfektionsreagenz und Stimulationsmedium.

Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurden die Zellen in zwei Waschschritten mit FACS-Puffer gewaschen und in einem Volumen von 300µl FACS-Puffer aufgenommen.

2.2.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Allgemeines Schema

Die Messung der unterschiedlichen Zytokine folgte stets einem einheitlichen Schema:

Coaten - Bindung des Antikörpers an die Mikrotiterplatte:

Der Antikörper wurde in PBS verdünnt und 50 µl/well aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 4 Stunden.

2x Waschen mit Waschpuffer

Blocken - Reduzierung der Hintergrundaktivität durch freie Proteinbindungsstellen:

250 µl/well Blockpuffer wurden aufgetragen und bei 4°C über Nacht inkubiert.

2x Waschen mit Waschpuffer

Proben-/Standardauftrag:

Die Proben wurden in den unten angegebenen Mengen entsprechend der jeweiligen Zytokinbestimmung eingesetzt. Das Standardprotein wurde in Blockpuffer eingesetzt. Die Doppelbestimmung wurde von der Ausgangskonzentration ausgehend 1:2 in 10 Schritten verdünnt. Die Inkubation für zwei Stunden fand bei Raumtemperatur statt.

2x Waschen mit Waschpuffer

Detektionsantikörper:

Der Antikörper wurde verdünnt in Blockpuffer und 50 µl/well aufgetragen.

Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur.

2x Waschen mit Waschpuffer

Enzymzugabe:

Soweit der Detektionsantikörper nicht schon selbst enzymgebunden vorlag, wurde nun ein entsprechendes Enzym in Blockpuffer verdünnt und mit 50 µl/well aufgetragen.

Eine kurze Inkubation erfolgte für 30-60 min bei Raumtemperatur.

2x Waschen mit Waschpuffer

Substratzugabe - colorimetrische Bestimmung der Enzymaktivität:

3,3',5,5-Tetramethylbenzidin (TMB) oder o-Phenylendiamin (oPD) wurden für die Farbreaktion eingesetzt. oPD wurde in Substratpuffer gelöst und mit 30%igen H₂O₂ versetzt. 50 µl /well wurden aufgetragen.

Stoppreaktion:

Die Farbreaktion wurde mit 0,2 N H₂SO₄ abgestoppt.

Menge der eingesetzten Substanzen

humane ELISA

Tabelle 9

	IFN- α
Coating-Antikörper	10 $\mu\text{g/ml}$
Standard Ausgangs-well/ Proben	4 ng/ml / Proben unverdünnt
Detektionsantikörper	1:1000 aus dem original Tube
Enzym	-
Substrat	TMB

murine ELISA

Tabelle 10

	IFN- α	IL-6
Coating-Antikörper	1 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
Standard Ausgangs-well/ Proben	2000 U/ml / Proben unverdünnt	10 ng/ml / Proben 1:10 verdünnt
Detektionsantikörper	0,5 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$
Enzym	1:500	1:8000
Substrat	OPD	OPD

Puffer für ELISA

Tabelle 11

Blockpuffer	Waschpuffer	Substratpuffer
<ul style="list-style-type: none"> ▪ BSA 1% ▪ Tween 0,05 % ▪ PBS def. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 10x PBS def. ▪ Tween 0,05 % ▪ H₂O 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Na₂HPO₄ x 2 H₂O 11,87g ▪ C₆H₈O₇ x H₂O 7,3g ▪ H₂O 1 Liter

2.2.5 Isolierung von Zellen aus murinem Knochenmark

Zelltypen wie pDCs, cDCs oder Makrophagen lassen sich aus Stammzellen des Knochenmarks von Mäusen generieren, indem man sie mit ausgewählten Stimulantien versetzt. Die einfachste Weise, Knochenmarkszellen zu gewinnen, ist das Spülen der Röhrenknochen von Oberschenkel (Femur) und Unterschenkel (Tibia und Fibula). Zu diesem Zweck wurde das folgende Verfahren angewendet:

- Präparation der Oberschenkel (Femur)- und Unterschenkelknochen (Tibia) der Maus. Dabei ist darauf zu achten, dass die Knochen möglichst sauber freigelegt sind, um im weiteren Verlauf eine maximale Menge an Stammzellen zu erhalten.
- Eröffnung der Knochen am proximalen und distalen Ende (soweit dies nicht schon im Zuge der Präparation geschehen ist).
- Spülen der Röhrenknochen: Eine Spritze (möglichst kleine Nadel) wird in den inneren Hohlraum des Knochens eingeführt. Unter vorsichtiger Bewegung wird das Mark nun mit RPMI complete Medium gespült bis der ehemals rötlich schimmernde Knochen eine blasse Farbe angenommen hat.
- Knochenmark und RPMI complete Medium werden in einer 10cm Kulturschale aufgefangen und im Anschluss durch wiederholtes auf- und abpipettieren mit dem Pipetboy zu einer möglichst homogenen Flüssigkeit umgesetzt.
- Zentrifugation für 6min und 1300rpm und anschliessendes Verwerfen des Überstandes.
- Resuspension mit 3ml Red Blood Cell Lyses (Sigma) pro Maus. Nach einer Inkubationszeit von 5min wurde die Lyse durch Zugabe von RPMI complete Medium abgestoppt, danach erfolgte erneutes Zentrifugieren unter den oben genannten Bedingungen mit anschliessendem Verwerfen des Überstandes.
- Aufnahme der Zellen in 5ml RPMI complete Medium und Zellzahlbestimmung. Aussäen der Zellen entsprechend der Bedingungen unter 2.1.3.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von RNA40 durch Stimulation von TLR7-exprimierenden Zellen

3.1.1 Allgemeine Erläuterungen

Ziel dieser Untersuchung ist es, die Transfektion von TLR7-exprimierenden Zellen mit RNA40 zu untersuchen. Es soll geklärt werden, in wie weit sich die RNA40 nach Inkubation mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien in ihrer Immunaktivierung verändert und worin evt. bestehende Divergenzen begründet sind. Die Versuche wurden mit humanen PBMC, Raw-Makrophagen und Dendritischen Zellen aus einer Flt3-Ligand Kultur durchgeführt. Die Flt3-Ligand DCs stammen sowohl aus TLR7^{+/+} Mäusen (BL6/wt) als auch aus TLR7^{-/-} Mäusen. So kann die Abhängigkeit des Transfektionsergebnisses von TLR7 beurteilt werden.

Für die Stimulationsexperimente mit RNA40 wurden die folgenden Transfektionsreagenzien eingesetzt:

Tabelle 12

Handelsname	Hersteller	Handelsname	Hersteller
1. DOTAP	Roche	7. Dharmafect 3	Dharmacon
2. Lipofectamine2000	Invitrogen	8. Dharmafect 4	Dharmacon
3. Lipofectamine	Invitrogen	9. Gene Porter	Genlantis
4. Lipofectin	Invitrogen	10. Superfect	Qiagen
5. Dharmafect 1	Dharmacon	11. Hiperfect	Qiagen
6. Dharmafect 2	Dharmacon	12. Polyfect	Qiagen

Die Stimulation erfolgte nach dem erläuterten Schema in Abschnitt 2.2.1.

In den folgenden Darstellungen der Ergebnisse werden nicht alle untersuchten Transfektionsreagenzien näher erläutert. Es wurde eine Einteilung in Gruppen vor-

genommen, aus denen jeweils charakteristische Vertreter vorgestellt werden sollen. Anhand ihrer IFN- α -Produktion nach Stimulation mit RNA40 lassen sich die Transfektionsreagenzien in drei Hauptgruppen unterteilen:

Gruppe 1: deutlich positive Zytokinausschüttung
Gruppe 2: reduzierte Zytokinausschüttung
Gruppe 3: positive Zytokinausschüttung, jedoch hohe
 Eigenstimulationsfähigkeit des Transfektionsreagenz

Die Testung der einzelnen Transfektionsreagenzien bezüglich dieser Eigenschaften ergab die anschließende Einteilung (siehe Tabelle 12). Da die Ergebnisse von humanem und murinem System nicht miteinander vergleichbar waren, erfolgt die gesonderte Auflistung.

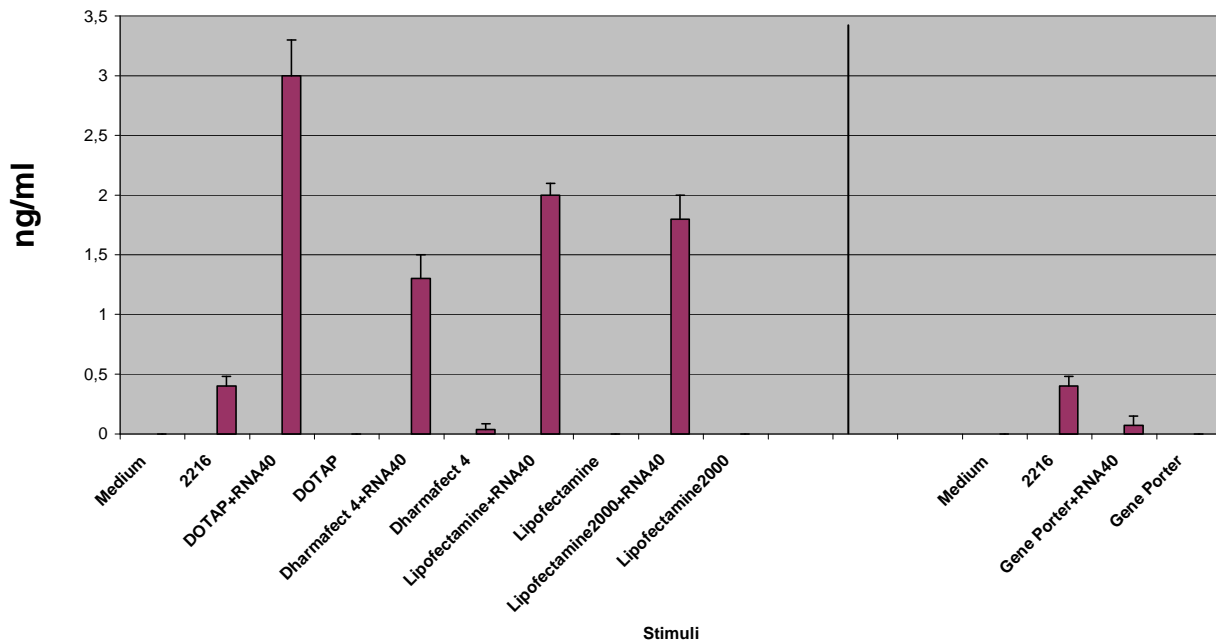
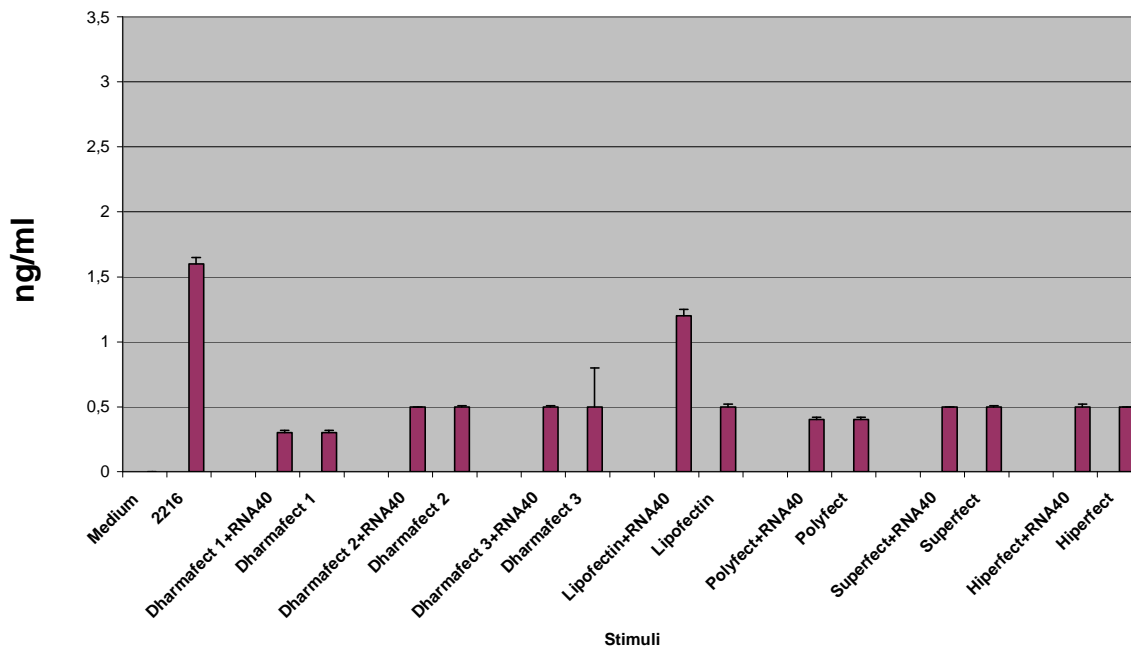
Tabelle 13

	mIFN-α	huIFN-α
<i>Gruppe 1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • DOTAP • Dharmafect 2 • Dharmafect 3 • Lipofectamine 	<ul style="list-style-type: none"> • DOTAP • Dharmafect 4 • Lipofectamine • Lipofectamine2000
<i>Gruppe 2</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Lipofectin • Lipofectamine2000 • Gene Porter 	<ul style="list-style-type: none"> • Gene Porter
<i>Gruppe 3</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Dharmafect 1 • Dharmafect 4 • Superfect • Polyfect • Hiperfect 	<ul style="list-style-type: none"> • Dharmafect 1 • Dharmafect 2 • Dharmafect 3 • Lipofectin • Superfect • Hiperfect • Polyfect

Die Gründe für diese unterschiedlichen Verhaltensweisen sollen in den folgenden Experimenten untersucht werden. Außerdem soll nach weiteren Charaktermerkmalen der einzelnen Transfektionsreagenzien gesucht werden.

Einteilung der Reagenzien nach ihrem Verhalten in humanen PBMC

Abb.: 3.1

A: huIFN- α Gruppe 1 und 2B: huIFN- α Gruppe 3Abb.:3.1 Gruppeneinteilung der Transfektionsreagenzien nach ihrer IFN- α Produktion in humanen PBMC.

Es wurden 3×10^6 Zellen/ml ausplattiert. Die Reagenzien wurden nach DOTAP-Protokoll eingesetzt und mit RNA40 für 15 min vorinkubiert, bevor sie zu den Zellen hinzugefügt wurden. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden bei 37°C, danach wurden die Überstände von den Proben abgenommen und im ELISA ausgewertet.

Für die Transfektion von RNA40 in humane PBMC haben sich laut der durchschnittlich produzierten Zytokinmenge von IFN- α DOTAP (3ng/ml), Dharmafect 4 (1,25ng/ml), Lipofectamine (2ng/ml) und Lipofectamine2000 (1,75ng/ml) als besonders geeignet herausgestellt (Abb.3.1 A). Es existiert nur ein Reagenz, mit dessen Hilfe RNA40 nur zu einer reduzierten IFN- α -Ausschüttung geführt hat: Gene Porter mit durchschnittlich 0,1ng/ml (Abb.3.1 A). Der größte Teil der verwendeten Produkte weist jedoch die Fähigkeit auf, die Zytokinproduktion auch ohne Zugabe von RNA40 unspezifisch selbst zu stimulieren (Abb.3.1 B).

So induzieren alle Reagenzien der Gruppe 3 sowohl mit als auch ohne Zugabe von RNA40 eine Zytokinmenge zwischen 0,25 und 0,5ng/ml IFN- α : Dharmafect 1 (0,25ng/ml), Dharmafect 2 (0,5ng/ml), Dharmafect 3 (0,5ng/ml), Polyfect (0,37ng/ml), Superfect (0,5ng/ml) und Hiperfect (0,5ng/ml).

Die einzige Ausnahme bildet Lipofectin. Hier kann durch die Zugabe von RNA40 eine Zytokinvermehrung von 0,5ng/ml IFN- α (ohne RNA40) auf 1,25ng/ml (mit RNA40) erreicht werden (Differenz 0,75ng/ml).

Die Transfektionseffizienz wurde verglichen mit Oligodesoxyribonukleotid (ODN) ODN 2216. Hierbei handelt es sich um einen spezifischen Liganden für TLR9. ODN 2216 ist eine CpG-A DNA, die typischerweise die Produktion großer Mengen IFN- α in pDCs induziert.

In den vorliegenden Versuchen ist die Menge des TLR7-abhängig gebildeten IFN- α nach der Transfektion mit RNA40 größer als nach Stimulation der Zellen mit ODN ODN 2216 über TLR9.

Einteilung der Reagenzien nach ihrem Verhalten in murinen Flt3-Ligand DCs

Abb.: 3.2

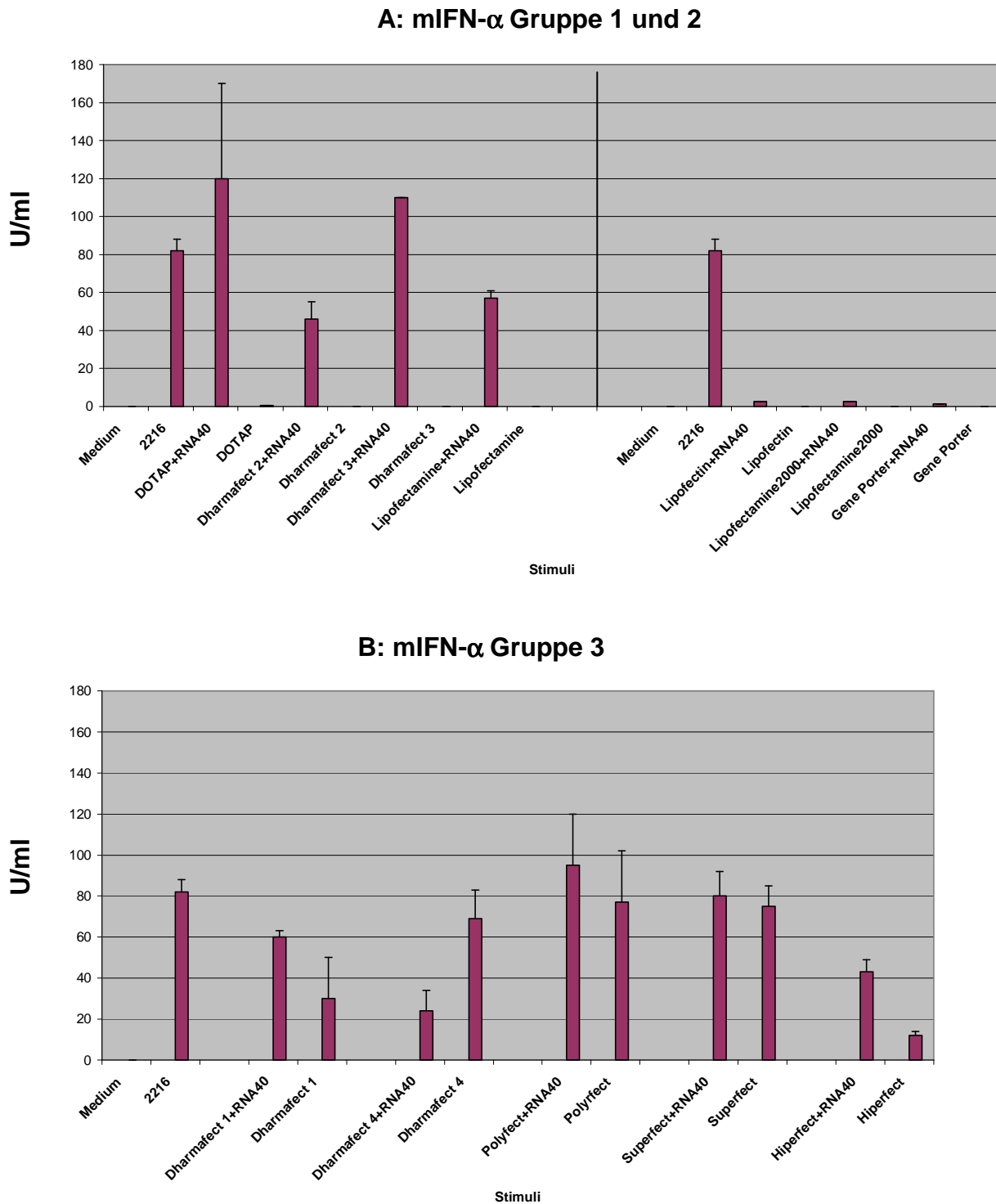


Abb.:3.2 Gruppeneinteilung der Transfektionsreagenzien nach ihrer IFN- α Produktion in Flt3-Ligand Kultur DCs. Es wurden 1×10^6 Zellen/ml ausplattiert. Die Reagenzien wurden nach DOTAP-Protokoll eingesetzt und mit RNA40 für 15 min vorinkubiert, bevor sie zu den Zellen hinzugefügt wurden. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden bei 37°C, danach wurden die Überstände von den Proben abgenommen und im ELISA ausgewertet.

Die Auswertung der Zytokinproduktion der murinen Zellen nach Stimulation mit RNA40 und unterschiedlichen Reagenzien ergab eine gute Funktionalität bezüglich ihrer IFN- α Produktion für die Standard-Substanz DOTAP (120U/ml). Weiterhin zeigten Dharmafect 2 (50U/ml), Dharmafect 3 (110U/ml) und Lipofectamine (55U/ml) eine spezifische Stimulation mit RNA40 (Abb.3.2 A). Die Produkte, die zu fast keiner IFN- α Bildung führten, waren Lipofectin (2U/ml), Lipofectamine2000 (2U/ml) und Gene Porter (1U/ml) (Abb.3.2 A).

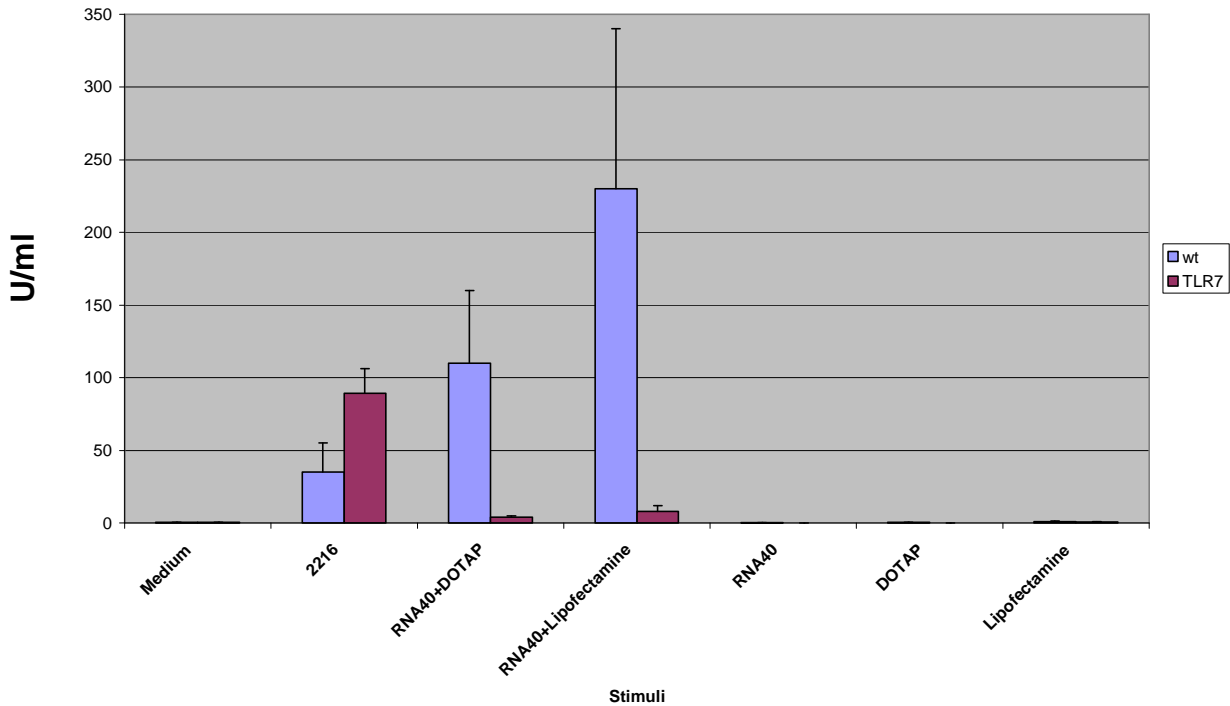
Eigenstimulatorische Eigenschaften, die Produktion von Zytokinen ohne Kombination mit dem eigentlichen Stimulus RNA40, können Dharmafect 1 (60U/ml mit RNA40, 30U/ml ohne RNA40; Differenz 30U/ml), Dharmafect 4 (25U/ml mit RNA40, 70U/ml ohne RNA40; Differenz 45U/ml), Superfect (80U/ml mit RNA40, 75U/ml ohne RNA40; Differenz 5U/ml), Hiperfect (43U/ml mit RNA40, 12U/ml ohne RNA40; Differenz 31U/ml) und Polyfect (95U/ml mit RNA40, 75U/ml ohne RNA40; Differenz 20U/ml) zugeschrieben werden (Abb.3.2 B).

Im Vergleich von humanem und murinem System zeigt sich, dass die Zellen in Abhängigkeit von dem benutzten Transfektionsreagenz unterschiedlich auf die Stimulation mit RNA40 reagieren. Die hohen eigenstimulatorischen Fähigkeiten mancher Produkte lassen sich jedoch in beiden Systemen nachweisen.

Zusammenhang Stimulierung TLR7 und ausgewähltes Transfektionsreagenz:

Abb.: 3.3

A: mIFN- α - wt und TLR7ko Mäuse



B: mIL-6 - wt und TLR7ko Mäuse

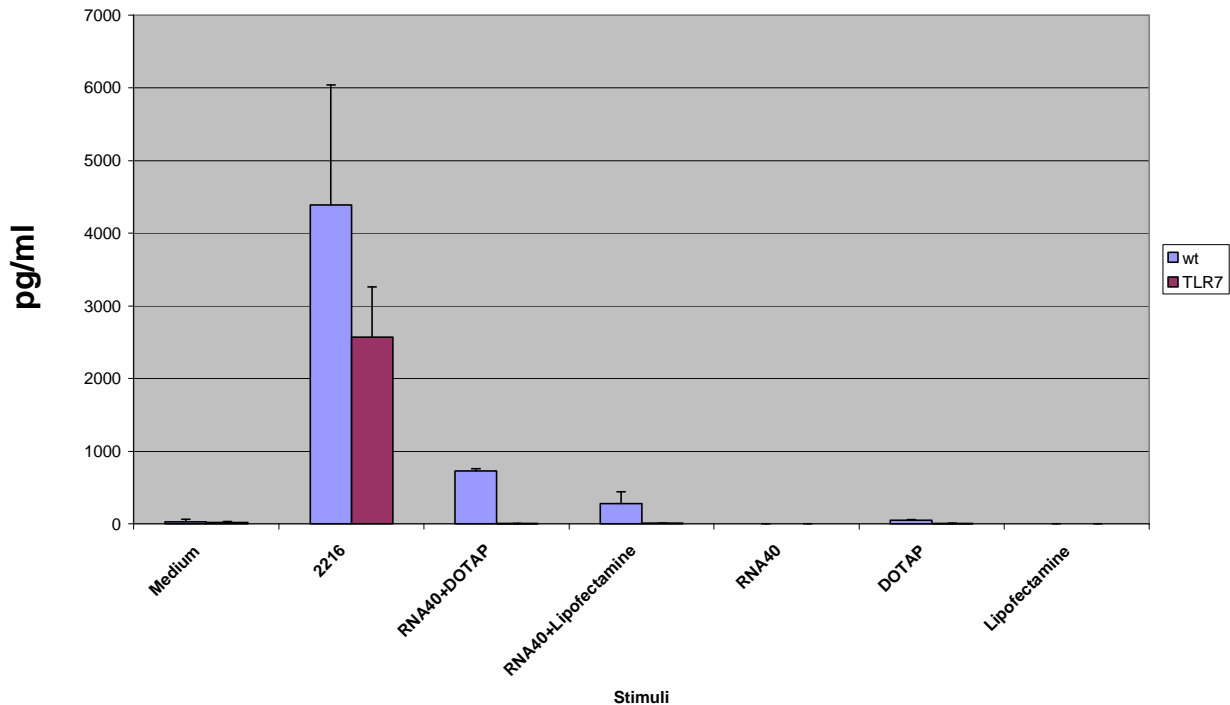


Abb.:3.3 Abhängigkeit der TLR7-Stimulation vom ausgewählten Transfektionsreagenz in Flt3-Ligand Kultur DCs. Es wurden 1×10^6 Zellen/ml ausplattiert. Die Reagenzien wurden nach DOTAP-Protokoll eingesetzt und mit RNA40 für 15 min vorinkubiert, bevor sie zu den Zellen hinzugefügt wurden. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden bei 37°C, danach wurden die Überstände von den Proben abgenommen und im ELISA ausgewertet.

Der größte Teil der getesteten Transfektionsreagenzien hat sich in TLR7-ko Zellen aus einer Flt3-Ligand Kultur entsprechend der Gruppeneinteilung für IFN- α (siehe Seite 39) verhalten. Auch für IL-6 ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

Allerdings hat sich in Bezug auf das Reagenz Lipofectamine ein ähnliches Verhalten darstellen lassen wie für DOTAP: In Zellen, die aus einer wt-Maus generiert wurden, zeigte es eine gute Funktionalität bezüglich der Zytokinproduktion. Dies gilt sowohl für IFN- α , wo 225U/ml produziert wurden (Abb.3.3A), als auch für IL-6 (Abb.3.3B). Hier wurden 350 pg/ml gebildet. Vergleichend hierzu wurden unter Zuhilfenahme von DOTAP IFN- α 110 U/ml (Abb.3.3A) und IL-6 700 pg/ml (Abb.3.3B) gebildet.

In Zellen aus einer TLR7-ko Kultur verhielt sich die Zytokinbildung deutlich anders: Die Produktion reduzierte sich bei IFN- α auf 10U/ml (Abb.3.3A) und bei IL-6 auf 50 pg/ml (Abb.3.3B) für Lipofectamine. Das Bild für für DOTAP ist entsprechend: IFN- α 5 U/ml (Abb.3.3A) und IL-6 10 pg/ml (Abb.3.3B).

3.1.2 FACS-Analyse

Aufnahme von fluoreszenzmarkierter RNA40 in unterschiedliche Zellen

3.1.2.1 Allgemeines

Unter Zuhilfenahme einer fluoreszenzmarkierten RNA, die in einer 1:10 Mischung mit der Standard-RNA kombiniert wurde, sollte die Aufnahme der RNA in die Zellen überprüft werden.

Hierfür wurde sie mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien vorinkubiert.

Im Hinblick auf eine evt. fehlende Zytokinproduktion in ELISA-Experimenten kann hier untersucht werden, ob das Reagenz überhaupt von den Zellen aufgenommen wird oder die Aktivierung der Zelle schon daran scheitert, dass der Stimulus das Zellinnere nicht erreicht.

Um sicherzugehen, dass die Aufnahme der Transfektionsreagenzien in allen verwendeten Zellen stattfindet, erfolgten die Versuche in unterschiedlichen Zelltypen. Es wurden RAW-Makrophagen eingesetzt, da diese auch für die Mikroskopie genutzt wurden.

Weitere Zellen waren DCs aus einer Flt3-Ligand Kultur, sowohl von TLR7^{+/+} (BL6/wt) als auch TLR7^{-/-} Mäusen. Da die humanen PBMC aus einer sehr gemischten Population bestehen, ist es schwer, bestimmte Zelltypen zu charakterisieren. Des Weiteren können auch individuelle Eigenschaften eines jeden Spenders dazu führen, dass sich die Zellen sehr unterschiedlich verhalten. Aus diesen Gründen soll im weiteren Verlauf das Hauptaugenmerk auf Flt3-Ligand DCs und RAW-Makrophagen gelegt werden.

3.1.2.2 Aufnahme der Alexa488-markierten RNA40 mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien

Da ein großer Teil der Zytokinbestimmung in den ELISA-Experimenten in murinen Zellen stattfand, ist auch die Aufnahme der Transfektionsreagenzien in diese Population geprüft worden.

Abb.: 3.4

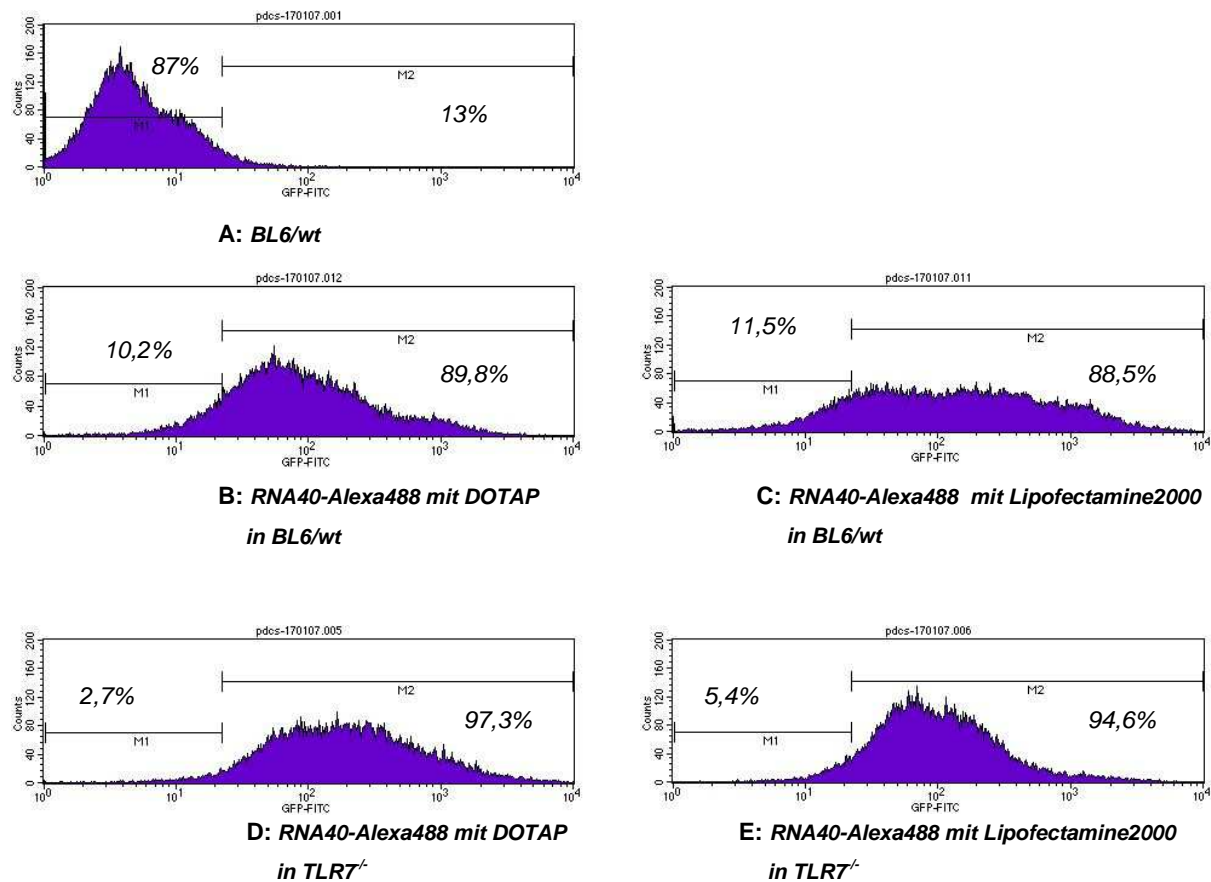
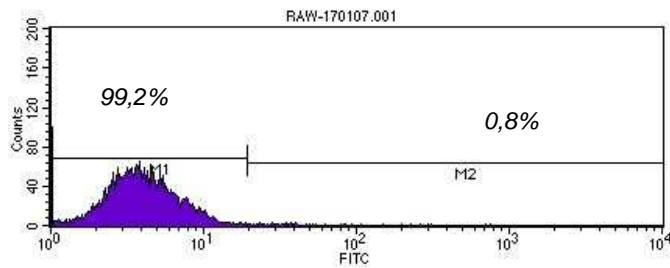
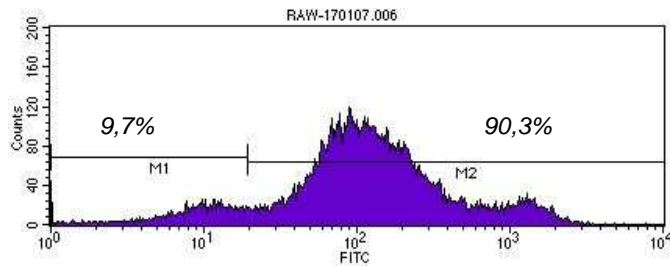
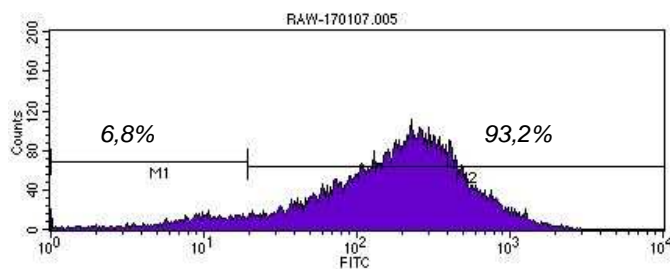


Abb.:3.4 Aufnahme von RNA40-Alexa488 mit DOTAP und Lipofectamine2000 in Flt3-Ligand Kultur DCs von BL6/wt- und TLR7^{-/-} Mäusen. Darstellung der Eigenfluoreszenz der BL6/wt-Zellen (A) als Negativkontrolle, d.h. mit nicht transfizierten Zellen. DOTAP (B) und Lipofectamine2000 (C) wurden für 15 min inkubiert mit RNA40/RNA40-Alexa488 (10:1) in einer Konzentration von 4µg und dann auf die Zellen aufgetragen, die aus BL6/wt- Mäusen isoliert wurden. Die eingesetzte Zellmenge betrug 1x10⁶ Zellen/ml. Das Transfektionsgemisch wurde nun für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde nach Zugabe von FACS-Puffer die Menge der fluoreszenzmarkierten RNA bestimmt. M1 zeigt die Anzahl der Zellen, die keine markierte RNA aufgenommen haben, wohingegen M2 die RNA-positive Fraktion beschreibt. Bei der Untersuchung von DOTAP (D) und Lipofectamine2000 (E) in TLR7^{-/-} herrschten vergleichbare Versuchsbedingungen.

Es zeigen sich Unterschiede in der aufgenommenen Prozentmenge. Da jedoch die Werte immer im Bereich von 90% liegen, kann davon ausgegangen werden, dass eine Aufnahme des markierten Oligonukleotide in die Zellen stattgefunden hat.

Die mikroskopischen Auswertungen fand meist in RAW-Makrophagen statt. Daher soll vergleichend zu den DCs (Abb.3.4) auch die Aufnahme in diesen Zelltyp gezeigt werden (Abb.3.5).

Abb.: 3.5**A: RAW-Makrophagen****B: RNA40-Alexa488 mit DOTAP in RAW-Makrophagen****C: RNA40-Alexa488 mit Lipofectamine2000 in RAW-Makrophagen****Abb.:3.5 Aufnahme von RNA40-Alexa488 mit DOTAP und Lipofectamine2000 in RAW-Makrophagen.**

Darstellung der Eigenfluoreszenz der RAW-Makrophagen (A). DOTAP (B) und Lipofectamine2000 (C) wurden für 15 min inkubiert mit RNA40/RNA40-Alexa488 (10:1) in einer Konzentration von 4 μg und dann auf die Zellen aufgetragen. Die eingesetzte Zellmenge betrug 1×10^6 Zellen/ml. Das Transfektionsgemisch wurde nun für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde nach Zugabe von FACS-Puffer die Menge der fluoreszenzmarkierten RNA bestimmt. M1 zeigt die Anzahl der Zellen, die keine markierte RNA aufgenommen haben, wohingegen M2 die RNA-positive Fraktion beschreibt.

Es zeigt sich, dass die RAW-Makrophagen die Alexa488-markierte RNA40 in ähnlicher Menge aufnehmen wie die zuvor getesteten murinen Zellpopulationen.

Beide Zelltypen nehmen die fluoreszenzmarkierte RNA40 schon nach einer Stunde Inkubation gut auf. Die Menge der aufgenommenen RNA in Flt3-Ligand DCs und RAW-Makrophagen ist miteinander vergleichbar.

3.1.3 Mikroskopische Analyse

Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von RNA40

3.1.3.1 Allgemeines

Um die Experimente, die mittels FACS durchgeführt wurden, zu vervollständigen, wurde die Aufnahme der Transfektionsreagenzien auch mikroskopisch untersucht. Hierzu wurden die Zellen nach dem erläuterten Schema stimuliert. Benutzt wurde hierfür erneut die 1:10-Mischung aus zwei unterschiedlichen RNAs, wie bereits im Abschnitt 2.2.1 erläutert.

Ergänzend wurden Aufnahmen erstellt, die zeigen sollen, ob die Zellen die Stimulation mit den einzelnen Transfektionsreagenzien überlebt haben. Fehlende Zytokinproduktion kann folglich nicht darin begründet sein, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Bildaufnahme bereits tot waren.

Des Weiteren ist die Untersuchung der Lokalisation der RNA40 ein besonders wichtiger Aspekt dieser mikroskopischen Experimente. Sie soll helfen, die Eigenschaften der RNA40 nach Inkubation mit verschiedenen Transfektionsreagenzien besser verstehen zu können.

3.1.3.2 Einzelaufnahmen verschiedener Transfektionsreagenzien

Die hier gezeigten Zellen sind RAW-Makrophagen. Es sollen die Aufnahme der fluoreszenzmarkierten RNA (jeweils linke Aufnahme) und das Überleben der Zellen nach der Stimulation (jeweils rechte Aufnahme, Durchlichtbild) demonstriert werden. Aufgrund ihres günstigen Kern-Zytoplasma-Verhältnisses haben sich die RAW-Makrophagen als gut geeignet für die Lokalisationsuntersuchungen erwiesen.

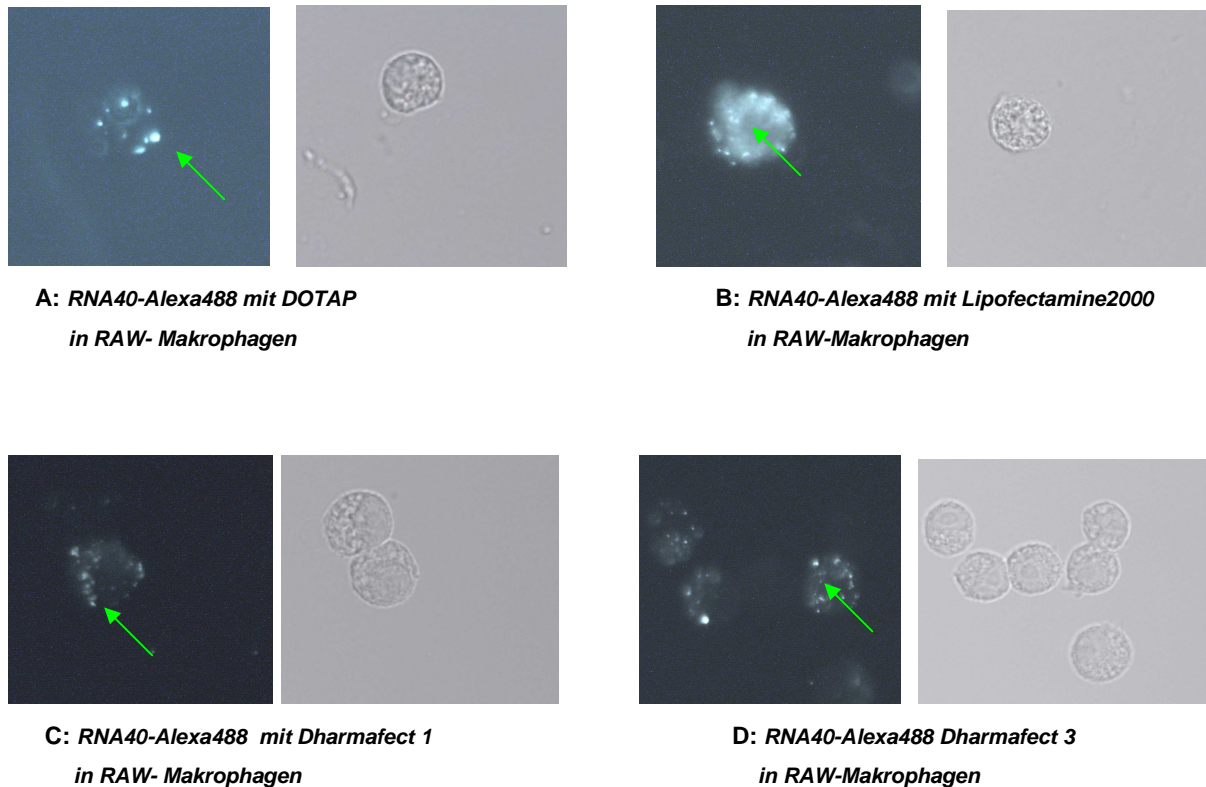
Abb.: 3.6

Abb.:3.6 Mikroskopische Darstellung der Aufnahme der Alexa488-markierten RNA40 in RAW-Makrophagen mittels Leica DMRB

DOTAP (A), Lipofectamine2000 (B), Dharmafect 1 (C) und Dharmafect 3 (D) wurden für 15 min inkubiert mit RNA40/RNA40-Alexa488 (10:1) in einer Konzentration von $4\mu\text{g}$ und dann auf die Zellen aufgetragen. Die eingesetzte Zellmenge betrug 3×10^6 Zellen/ml. Das Transfektionsgemisch inkubierte für eine Stunde bei 37°C , wurde anschließend gewaschen und inkubierte noch einmal für weitere 3 Stunden, um der bis dahin aufgenommenen RNA die Möglichkeit zu geben, sich intrazellulär zu verteilen. Nach Aufnahme in PFA und Fixierung mittels Zytospin auf Objektträgern erfolgte die mikroskopische Betrachtung.

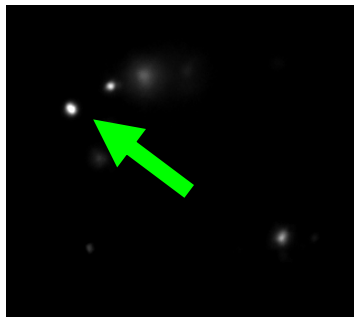
Aufgrund der Fähigkeit, die zelluläre Zytokinproduktion auch ohne Zugabe von RNA40 anzuregen, wurde auch Dharmafect 1 mikroskopisch analysiert. Vergleichend hierzu Dharmafect 3, da im murinen ELISA Unterschiede bestehen zwischen beiden Produkten.

Es wird deutlich, dass sich die RNA40-Alexa488 mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien jeweils anders lokalisiert. Am prägnantesten zeigen sich die Abweichungen im Vergleich von DOTAP mit Lipofectamine2000: DOTAP in vesikulärer Verteilung, Lipofectamine2000 in diffuser Verteilung im gesamten Zytoplasma. Dharmafect 1 und 3 haben ähnliche Verteilungsmuster und lassen sich am ehesten dem vesikulären Typ von DOTAP zuordnen.

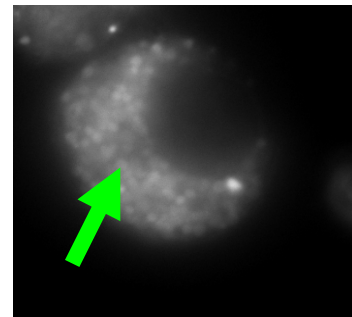
3.1.3.3 Kombinierte Stimulation mit zwei Transfektionsreagenzien

Im folgenden Abschnitt soll untersucht werden, ob zwei unterschiedliche Transfektionsreagenzien ein gemeinsames Ziel in der Zelle ansteuern oder evt. doch voneinander abweichende Kompartimente anstreben. Nachdem die Aufnahmen in 3.1.3.2 zeigen, dass DOTAP und Lipofectamine2000 sich in ihrem Verteilungsmuster unterscheiden und sie zuvor im murinen System auch schon zwei unterschiedlichen Gruppen zugeordnet wurden, wurde ein besonderes Augenmerk auf das Verhalten dieser beiden Transfektionsreagenzien gelegt.

Abb.: 3.7



A: RNA40-Alexa488 mit DOTAP in RAW-Makrophagen



B: RNA40-Alexa488 mit Lipofectamine2000 in RAW-Makrophagen

Abb.:3.7 Mikroskopische Darstellung der Aufnahme der Alexa488-markierten RNA40 in RAW-Makrophagen mittels Zeiss Axiovert

DOTAP (A) und Lipofectamine2000 (B) wurden für 15 min inkubiert mit RNA40/RNA40-Alexa488 (10:1) in einer Konzentration von 4µg und dann auf die Zellen aufgetragen. Die eingesetzte Zellmenge betrug 3×10^6 Zellen/ml. Das Transfektionsgemisch inkubierte für eine Stunde bei 37°C, wurde anschließend gewaschen und inkubierte noch einmal für weitere 3 Stunden, um der bis dahin aufgenommenen RNA die Möglichkeit zu geben, sich intrazellulär zu verteilen. Nach Aufnahme in PFA und Fixierung mittels Zytospin auf Objektträgern erfolgte die mikroskopische Betrachtung.

Es zeigt sich auch in diesen Einzelaufnahmen eine unterschiedliche intrazelluläre Anordnung der beiden verglichenen Transfektionsreagenzien, so dass ergänzend eine kombinierte Transfektion mit beiden Substanzen in RAW-Makrophagen durchgeführt wurde:

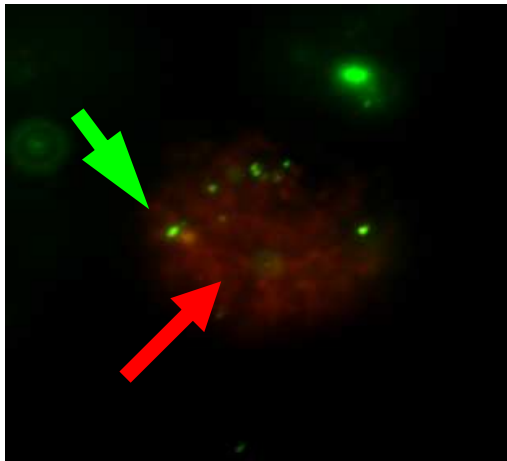
Abb.: 3.8

Abb.:3.8 Mikroskopische Darstellung der Doppeltransfektion von RAW-Makrophagen mit fluoreszenzmarkierter RNA40 in Kombination mit DOTAP und Lipofectamine2000. In dieser Transfektion wurden unabhängig voneinander DOTAP mit RNA40-Alexa488 (grüner Pfeil) und Lipofectamine2000 mit RNA40-Alexa546 (roter Pfeil) vorinkubiert. Die Menge von RNA und Transfektionsreagenz wurde hierfür halbiert. Nach 15 min wurden beide Ansätze zu 3×10^6 /ml RAW-Makrophagen hinzugegeben, sodass die Menge der RNA und die des Reagenz wieder vergleichbar ist mit den bisherigen Versuchen. Auch hier erfolgte nun eine Inkubation bei 37°C für 1 Stunde, ein Waschschrift und die erneute Inkubation der schon aufgenommenen RNA für 3 Stunden. Nach Aufnahme in PFA und Fixierung auf die Objektträger im Zytospin wurden die Bilder angefertigt.

Die farbliche Darstellung zeigt noch deutlicher, dass sich DOTAP in vesikulären Formationen anordnet, wohingegen die Verteilung von Lipofectamine2000 diffus im gesamten Zytoplasma stattfindet.

Die Gesamtheit der Aufnahmen zeigt, dass sich die RNA40 nach Inkubation mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzien in abweichenden Kompartimenten der Zelle wieder finden lässt. Nach Transfektion mit DOTAP (Abb.3.7 A und 3.8) erscheint die RNA40 nur in bestimmten Bereichen der Zelle, wohingegen Lipofectamine2000 eine generalisierte Verteilung im Zytoplasma (Abb. 3.7 B und 3.8) bewirkt.

3.1.4 Transfektionsbedingungen und ihr Einfluss auf das Überleben der Zellen

Einfluss von Inkubationszeit, Konzentration und Medium auf die Transfektion

3.1.4.1 Allgemeines

In der nun folgenden FACS-Analyse soll erneut ein Vergleich zwischen DOTAP, dem Vertreter der Gruppe 1 im murinen System, und Lipofectamine2000, Vertreter von Gruppe 2, stattfinden. Bewertet werden soll das Überleben der Zellen, die dafür erfolgten Stimulationen von Flt3-Ligand DCs mit RNA40 verliefen unter verschiedenen Bedingungen. Um die Population der DCs zu definieren zeigen zu können, dass die gewünschten Zellen vorhanden sind, wurden die Zellen zusätzlich vor der FACS-Messung mit B220 und CD11c gefärbt. Es zeigten sich 63,7% B220-positive Zellen und 33,3% CD11c-positive Zellen (Daten nicht gezeigt).

Im weiteren Verlauf wurde auch jede andere Probe während der Messung mit Propidiumiodid (PI) versetzt. Hierbei handelt es sich um einen Nukleinsäureinterkalator, der defekte Membranen passiert und sich an die DNA anlagert. Folglich eignet sich PI zur Darstellung bereits defekter bzw. toter Zellen.

Die Reagenzien wurden in der Standard-Konzentration von 1:10 laut DOTAP-Protokoll (Abschnitt 2.2.1) oder in reduzierter Menge mit einer Konzentration von 1:100 eingesetzt. Die jeweilige Menge erschließt sich aus der Klammer hinter der jeweiligen Reagenzien-Angabe.

In den anschließenden Messungen werden die Ergebnisse der gesamten, gemischten Zellpopulation abgebildet.

3.1.4.2 Inkubationszeit

Die Messungen am FACS wurden nach *einer* bzw. *vier* Stunden durchgeführt. Es wird geprüft, ob sich eine längere Verweildauer toxisch auf die Zellen auswirkt.

Abb.: 1

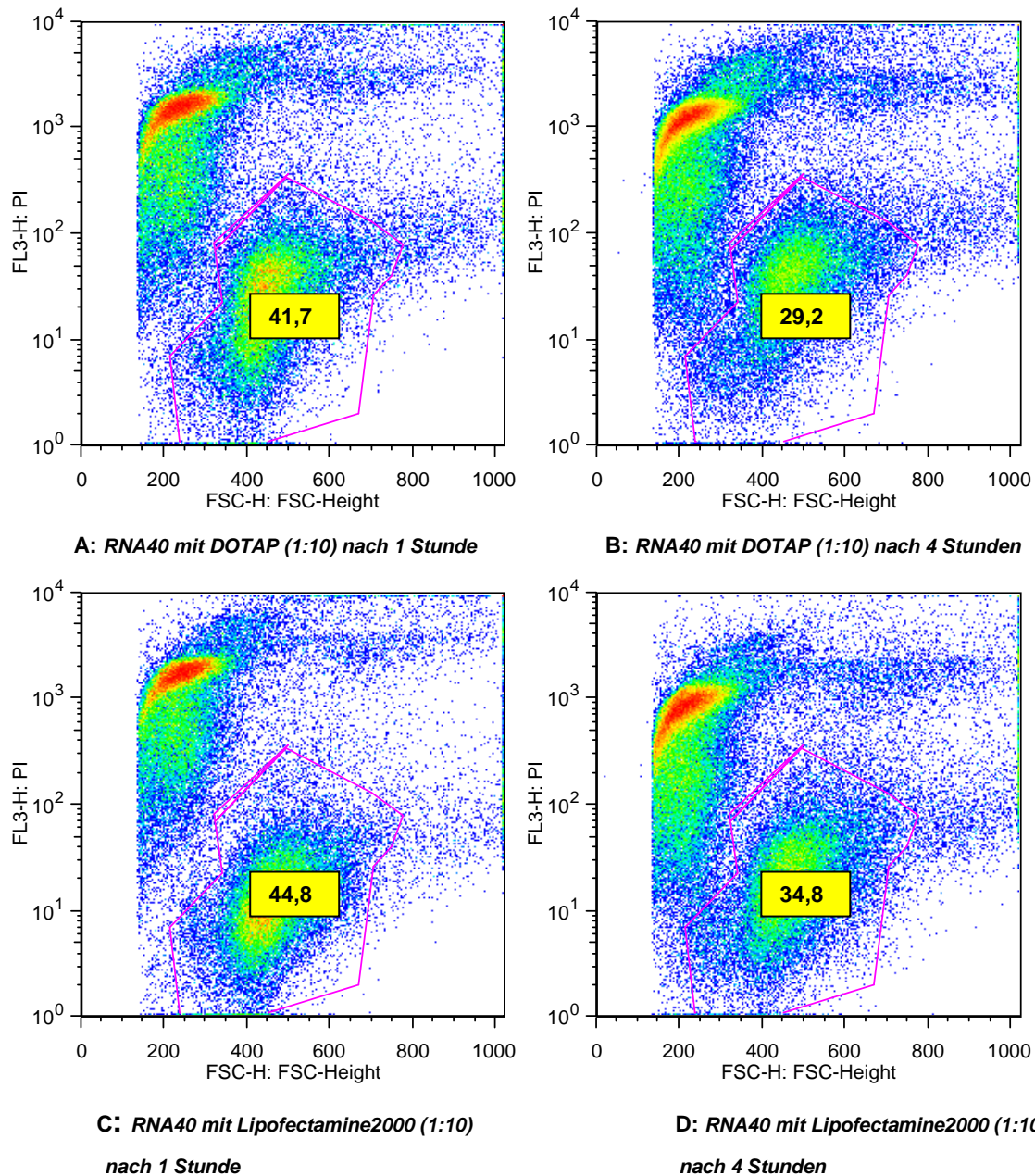


Abb.:3.9 Einfluss der Verweildauer von RNA40 nach Transfektion mit DOTAP oder Lipofectamine2000 auf das Überleben der Flt3-Ligand Kultur. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^6 /ml eingesetzt. Nach Vorinkubation der RNA40 mit dem Transfektionsreagenz wurde das Gemisch zu den Zellen hinzugefügt und für 1 beziehungsweise 4 Stunden bei 37°C inkubiert..

Der toxische Einfluss beider Transfektionsreagenzien nimmt bei längerer Verweildauer zu (Abb.3.9 B und D). Insgesamt überleben mit 34,8% nach 4 Stunden Inkubation deutlich mehr Zellen die Stimulation mit Lipofectamine2000 (Abb.3.9 D) als mit DOTAP (Abb.3.9 B), bei dem nur 29,2% überlebten.

3.1.4.3 Konzentration der Transfektionsreagenzien

Die Transfektionsreagenzien wurden nach DOTAP-Protokoll in einer 1:10 Verdünnung genutzt. Zusätzlich wurde die Konzentration in einer 1:100 Verdünnung reduziert, um eine mögliche Überlastung der Zellen in der Standardanwendung zu klären.

Abb.:

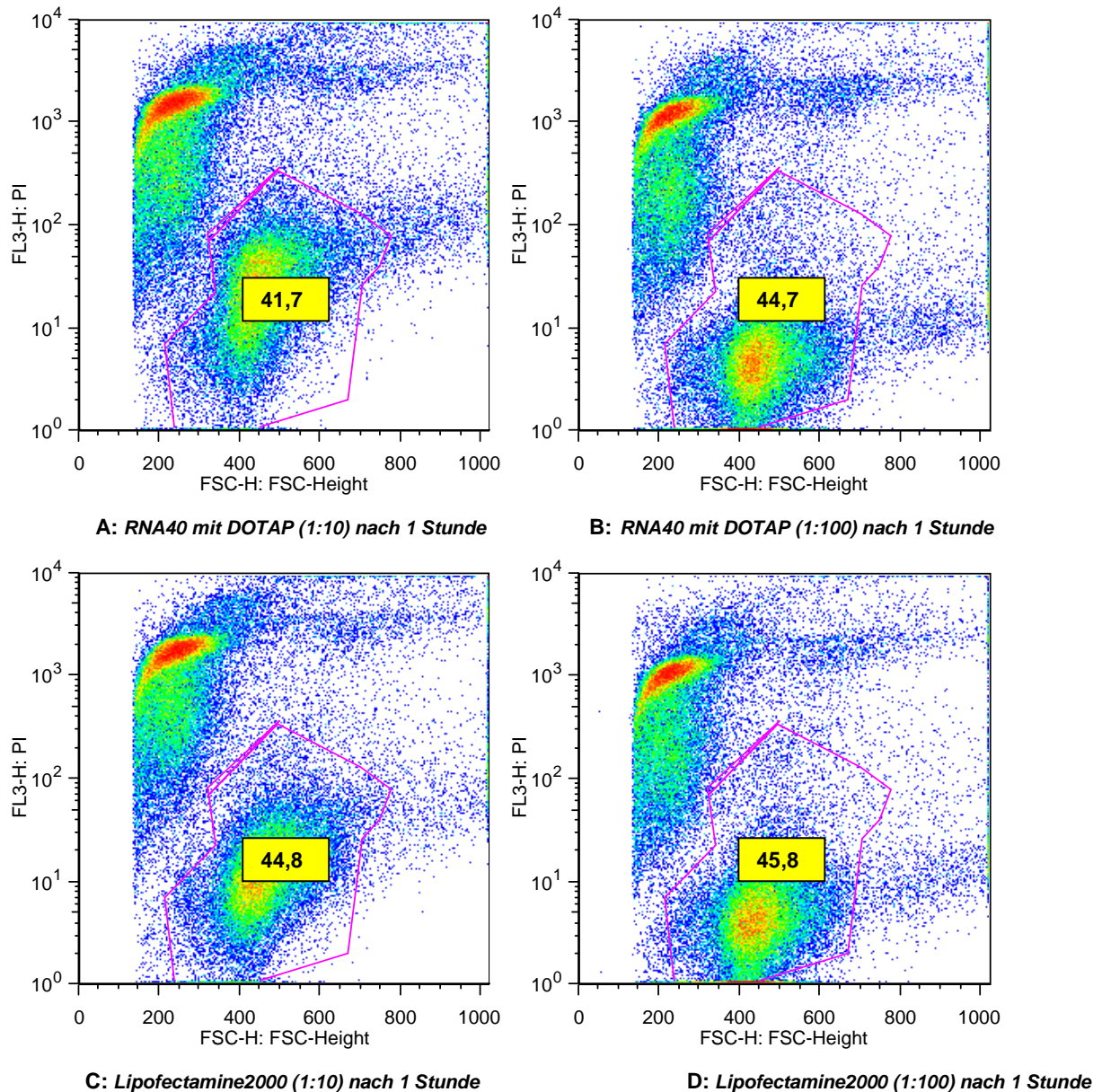


Abb.:3.10 Stimulation von Flt3-Ligand DC mit RNA40 und Transfektionsreagenzien in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Transfektionsreagenzien wurden laut DOTAP-Protokoll in einer 1:10-Verdünnung für die Versuche eingesetzt, so auch DOTAP (A) und Lipofectamine2000 (C). Vergleichend hierzu wurde die Konzentration in einer 1:100-Verdünnung reduziert (B, D) um den Einfluss der Menge zu überprüfen.

Eine verminderte Konzentration hat bei beiden Reagenzien einen protektiven Effekt auf das Überleben der Zellen (Abb.3.10 B und D). Im Bezug auf die absolute Zahl der toten Zellen ist der Einfluss der Konzentration von DOTAP gravierender – 41,7% der Zellen überleben die Standard-Konzentration von 1:10 (Abb.3.10 A), bei Stimulation mit Hilfe von Lipofectamine2000 unter gleichen Bedingungen sind es 44,8% (Abb.3.9 C). Unabhängig von der Konzentration des Reagenzes überleben etwa 3% mehr der Zellen die Stimulation mit Lipofectamine2000 als mit DOTAP.

3.1.4.4 Stimulationsmedium

Prinzipiell wurde mit einem selbst hergestellten Liposomenpuffer gearbeitet.

Da laut Angaben einiger Publikationen oder Hersteller jedoch käuflich erworbene Medien einen günstigeren Einfluss auf die Stimulation haben sollen, wurden hier exemplarisch OptiMEM (Roche) im Vergleich zum herkömmlichen Puffer eingesetzt.

Abb.:

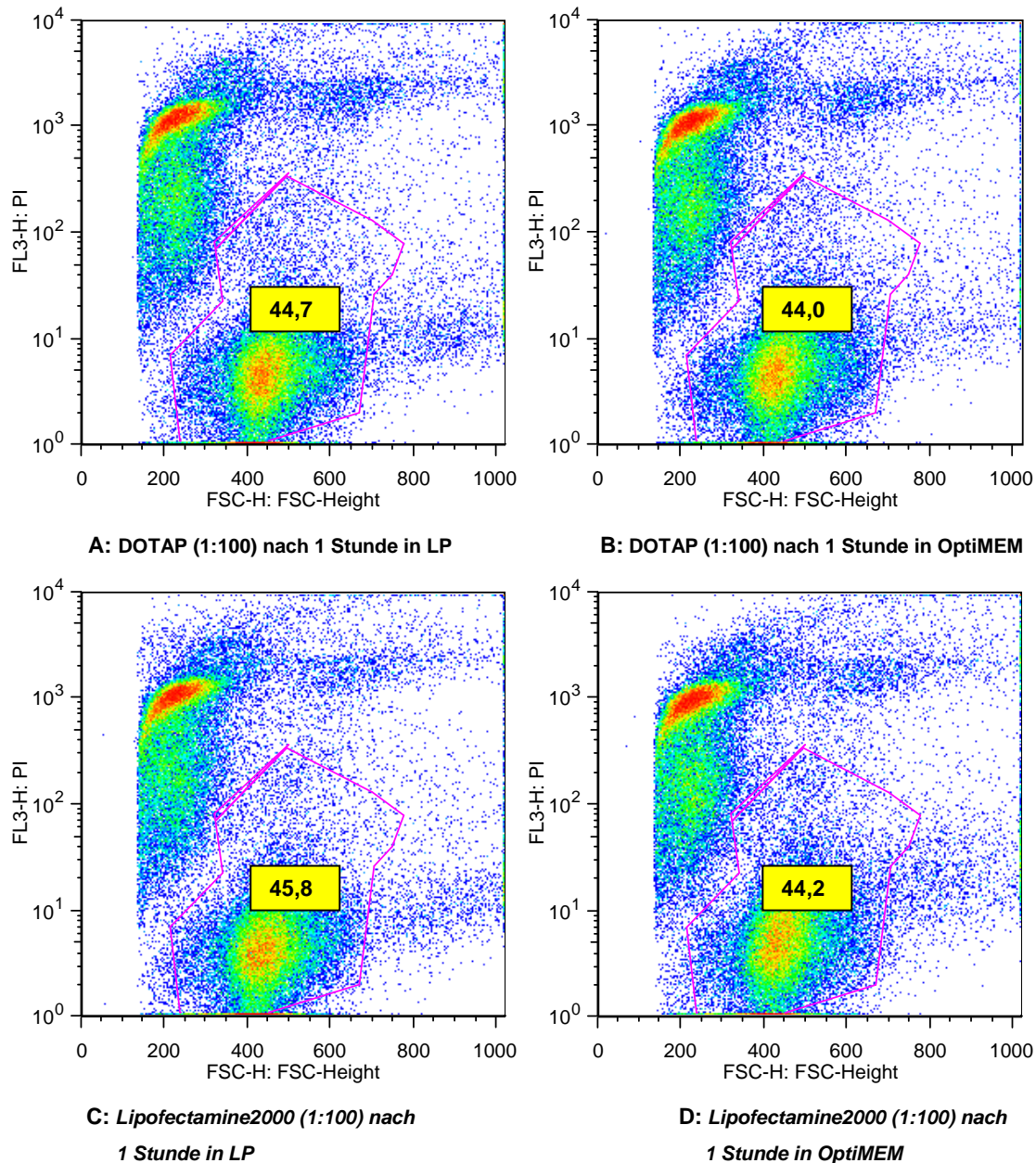


Abb.:3.11 Einfluss des Mediums auf den Zelltod. Die Transfektionsbedingungen entsprechen den vorangehenden Versuchen. Die Toxizität von DOTAP (A,B) und Lipofectamine2000 (C,D) bei Stimulation der Zellen mit RNA40 wurde jeweils im selbst hergestellten Liposomenpuffer mit dem käuflich erworbenen OptiMEM-Medium verglichen. Die Stimulation erfolgte 1 Stunde bei 37°C, die Konzentration der Transfektionsreagenzien betrug 1:100.

Die Auswahl des Transfektionsmediums hat einen sehr geringen Einfluss auf das Überleben der Zellen. Diese Beobachtung ist unabhängig von DOTAP (Abb.3.11 A und B) und Lipofectamine2000 (Abb.3.11 C und D), wo die Anzahl der lebenden Zellen mit Liposomenpuffer jeweils gering höher ist als mit OptiMEM: bei DOTAP beträgt der Unterschied 0,7% und bei Lipofectamine2000 1,6%.

Zusammenfassend zeigen diese Versuche, welche Faktoren einen Einfluss auf das Überleben der Zellen nach Stimulation von RNA40 haben, die mit DOTAP oder Lipofectamine2000 vorinkubiert wurden.

Die zunächst untersuchte Inkubationszeit (Abb.3.9 A bis D) machte deutlich, dass eine längere Verweildauer des Transfektionsgemisches auf den Zellen zu vermehrtem Zelltod führt. Die Konzentration der eingesetzten Transfektionsreagenzien hat in der 1:10 Verdünnung prinzipiell einen ähnlichen Effekt (Abb.3.10 A bis D). Dem gegenüber steht die Auswahl der Medien, in denen die Versuche durchgeführt werden. Das hier eingesetzte OptiMEM (Abb.3.11 B und D) und der selbst hergestellt Liposomenpuffer (Abb.3.11 A und C) hatten keinen Einfluss auf die Zytotoxizität.

4 Diskussion

4.1 Stimulation von TLR7 mit RNA40 und der Einfluss der verwendeten Transfektionsreagenzien

Allgemeines

In der vorliegenden Arbeit sollte TLR7 und der Einfluss von RNA40 nach Kombination mit verschiedenen Transfektionsreagenzien auf diesen Rezeptor näher untersucht werden, um die Mechanismen der Immunstimulation besser verstehen zu können.

Toll-like Rezeptor 7 ist typischerweise gemeinsam mit TLR9 in pDCs vertreten, wo sie für die Induktion der Typ-I Interferone verantwortlich sind. Jedoch wurde das Vorkommen in jüngsten Veröffentlichungen auch in Fibrozyten beschrieben, durch welche eine first-line defence in Wunden unter anderem durch TLR7 vermittelt wird (Balmelli, Alves et al. 2008).

Da die Beteiligung von TLR7 schon bei Autoimmunkrankheiten wie dem Systemischen Lupus erythematodes (SLE) (Barrat, Meeker et al. 2007) und einer Vielzahl von viralen Erkrankungen wie Hepatitis C (Schott, Witt et al. 2008) oder Influenza A (Koyama, Ishii et al. 2007) nachgewiesen wurde, ist das Verständnis über die genauen Wirkmechanismen im Zuge neuer Therapiekonzepte unerlässlich. Beispielsweise können genetische Defekte dazu führen, dass es zu einer Überexpression von TLR7 kommt. Dieses kann im murinen Modell über den Y-chromosom-linked autoimmune accelerator (Yaa) zu einer Duplikation von TLR7 mit vermehrter Anfälligkeit für SLE führen (Krieg 2007). Weit schlimmer noch sind die inflammatorischen und autoimmunen Folgen, falls die Überexpression von TLR7 über die Duplikation hinausgeht (Deane, Pisitkun et al. 2007).

Die von uns eingesetzte RNA40 wurde synthetisch hergestellt und stellt einen Liganden für TLR7 dar. Ihre Sequenz basiert auf einem Teilabschnitt der HI-1 Virus RNA, der so genannten U5-Region. Diese Region zeichnet sich durch die zahlreich vorkommenden Nukleoside Guanosin und Uridin aus, welche sich als wichtige Faktoren in der Stimulation von TLR7 erwiesen haben (Heil, Hemmi et al. 2004).

Als weitere Liganden für TLR7 wurden bisher virale einzelsträngige RNA, doppelsträngige small interfering RNA (siRNA) und synthetische Imidazoquinoline beschrieben. Ein Sonderfall ist die Stimulation von TLR7 durch endogene RNA in apoptotischen Vesikeln, welche mit der Entstehung von bereits erwähntem SLE zusammenhängt (Vollmer, Tluk et al. 2005).

Die stimulatorischen Sequenzen sind sehr spezifisch. So konnte gezeigt werden, dass schon kleine Veränderungen in der Sequenz von immunstimulatorischer RNA dazu führen, dass die RNA keine Stimulation von TLR7 mehr bewirkt (Hornung, Barchet et al. 2008).

Unser Ziel in dieser Arbeit war es, TLR7 zu untersuchen. Dieses geschah hauptsächlich durch Stimulation mit einem spezifischen Liganden – der RNA40. Außerdem sollten Faktoren, die sich auf das Rezeptor-Ligand Verhältnis auswirken, identifiziert werden. Hierbei wurde in besonderem Maße auf den Einfluss von Transfektionsreagenzien eingegangen, mit deren Hilfe DNA und RNA die zellulären Membranen überwinden und an den intrazellulären Zielort gelangen können.

Die mit DOTAP transfizierte RNA40 erwies sich als potentester Immunstimulator für Toll-like Rezeptor 7

In den durchgeführten Versuchen zeigte sich sehr deutlich, dass die Immunstimulation von TLR7 durch RNA40 abhängig von dem eingesetzten Transfektionsreagenz ist. Wie auch von anderen Gruppen schon für Stimulationen mit DNA gezeigt (Boktov, Hirsch-Lerner et al. 2007), erfolgte in unseren Analysen in murinen Zellen die konstanteste IFN- α Produktion nach Inkubation der RNA40 mit DOTAP (Roche), wohingegen beispielsweise die Stimulation unter Zuhilfenahme von Gene Porter (Genelantis) unabhängig von Anwendung im humanen oder murinen System eine nicht relevante Zytokiantwort induzierte.

Worin kann diese Abhängigkeit von RNA40 und ihrem Transfektionsreagenz begründet sein?

Die Klärung dieser Frage ist von großem Interesse, da es für die Planung eines Stimulationsexperiments wichtig ist, eine konkrete Vorstellung von diesen Abhängigkeiten zu haben. Unsere Versuche haben gezeigt, dass die Auswahl eines Reagenzes sehr variable Auswirkungen auf den Readout einer Untersuchung haben kann, ja sogar die Zytokinproduktion trotz geeignetem Liganden völlig fehlen kann.

Im Fall von TLR7 war es möglich, einen Liganden mit Hilfe von DOTAP zu finden (Heil, Hemmi et al. 2004), was dieses Reagenz als geeigneten Hilfsstoff für Transfektionen identifiziert. Wir konnten diese Aussage bestätigen. Der Toll-like Rezeptor 7 ist im Endosom lokalisiert um einen Schutz vor Erkennung von endogener RNA zu gewährleisten. Das Transfektionsreagenz sollte folglich in der Lage sein, den Liganden über die Membranen bis hin zu seinem eigentlichen Ziel zu transportieren.

Die gute Funktionalität von DOTAP, besonders im murinen System, und die generell stark reduzierte Immunantwort auf RNA40 nach Inkubation mit Gene Porter, stellen zwei extrem voneinander abweichende Beispiele dar. Weitere von uns getestete Reagenzien befinden sich bezüglich ihrer funktionellen Eigenschaften mit RNA40 in einem Bereich zwischen diesen beiden Produkten.

Als sich im Zuge unserer Untersuchungen die Abhängigkeit der immunstimulatorischen Effekte der RNA40 von den Transfektionsreagenzien erwies, wollten wir die Ursachen für dieses Phänomen herausfinden. Anhand ausgewählter Aspekte soll nun in den folgenden Abschnitten gezeigt werden, wodurch die Stimulation von TLR7 mit einem spezifischen Liganden wie der RNA40 stattfinden kann und welchen Einfluss Transfektionsreagenzien auf diese Stimulation haben.

In besonderem Maße wurden die Mechanismen der TLR7-Aktivierung durch RNA40 nach folgenden Gesichtspunkten analysiert:

- intrazelluläre Lokalisation des Liganden und Bezug zu dem eingesetzten Reagenz
- Vergleich der TLR7-Stimulation in humanem und murinem System
- Immunaktivierende Eigenschaften von Transfektionsreagenzien in Abwesenheit eines bekannten Liganden
- Zytotoxische Einflüsse der Reagenzien

Um nach möglichen Ursachen für bestehende Unterschiede zwischen den RNA40/Reagenz-Kombinationen zu suchen, haben wir die *intrazellulären Lokalisationsmuster* von ausgewählten Lipoplexen näher betrachtet.

Die von uns angefertigten mikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass die RNA abhängig von dem verwendeten Reagenz unterschiedlich im Inneren der Zelle lokalisiert ist. Besonders auffällig sind hier die Abweichungen zwischen DOTAP und Lipofectamine2000. Dies ist erstaunlich, geht man doch eigentlich davon aus, dass die RNA40 unabhängig von dem Reagenz in das endosomal-lysosomale Kompartiment gelangen soll, um dort immunstimulatorisch zu wirken. Die Reagenzien beinhalten in diesem Zusammenspiel allenfalls die Rolle eines Hilfsstoffs, mit dessen Unterstützung die RNA40 ihren Rezeptor erreichen soll. Man würde folglich erwarten, dass sich die Lokalisation der RNA40 nach der Transfektion unabhängig vom eingesetzten Reagenz ähnlich darstellt. DOTAP verhält sich in unseren Untersuchungen jedoch fast konträr zu Lipofectamine2000. Die zytoplasmatische Verteilung ist vesikulär, das heißt, es lassen sich punktförmige Ansammlungen der aufgenommenen RNA40 im Zellinneren wiederfinden. In der ELISA-Messung erfolgt nach Stimulation mit RNA40 und DOTAP konstant die Bildung von IFN- α . Lipofectamine2000 hingegen verteilt die fluoreszenzmarkierte RNA40 im gesamten zytoplasmatischen Bereich, die Induktion der IFN- α Produktion ist hier verhältnismäßig gering.

Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen der intrazellulären Verteilung und der Immunstimulation besteht.

Welche Faktoren bestimmen aber die intrazelluläre Verteilung?

Für DOTAP hat sich zeigen lassen, dass es ein geeigneter Transporter ist um Liganden in das Endosom zu bringen und dort zu verweilen. Ursache hierfür kann der endosomale pH-Wert sein, der im frühen Endosom >6 beträgt und im späten Endosom bei 5,57 liegt. Jedoch haben andere Gruppen bewiesen, dass auch die Struktur des Liganden dessen Lokalisation beeinflusst: Im Fall des TLR7-verwandten TLR9 hängen Immunstimulation und Lokalisation auch davon ab, ob der Ligand in Micropartikeln vorliegt oder nicht (Guiducci, Ott et al. 2006).

Ist es möglich, dass Lipofectamine2000 auf Grund spezieller Eigenschaften andere Strukturen in der Zelle ansteuert als das Endosom? Für diese Hypothese sprechen

Beobachtungen anderer Gruppen. Diese konnten zeigen, dass eine TLR7-unabhängige IFN- α Produktion mittels eines bestimmten RNA-Subtyps erzielt werden kann. Hierbei wurde 5'triphosphat RNA mittels Lipofectamine2000 in die Zelle eingebracht und der zytoplasmatischer Rezeptor RIG-I stimuliert (Hornung, Ellegast et al. 2006). Es stellt sich daher die Frage, ob das Reagenz für eine Stimulation mit einem endosomalen Liganden geeignet ist oder für diese Transfektionen auf bewährte Produkte wie DOTAP zurückgegriffen werden sollte.

Wir sahen, dass die Verteilung der RNA40 nach Transfektion mit Lipofectamine2000 im gesamten Zytoplasma stattfindet. Es ist denkbar, dass durch eine mangelnde Bindung zwischen RNA40 und Lipofectamine2000 die RNA schon vor dem Erreichen der Zielstruktur abgebaut werden kann und so ihre immunstimulatorischen Eigenschaften verliert. Was wir dann im mikroskopischen Bild sehen, könnten Fragmente der ursprünglichen RNA sein bevor sie von RNasen völlig zersetzt ist. Diese Annahme erklärt die diffuse Verteilung der RNA im zytoplasmatischen Bereich.

Des Weiteren kann die Verweildauer der RNA im endosomalen Kompartiment eine wichtige Rolle spielen. Die Induktion von IFN- α über TLR9 mittels CpG hängt stark ab vom Subtyp des Liganden und dessen intrazellulären Lokalisation. So kann eigentlich nicht-stimulatorische CpG-B DNA durch DOTAP länger im Endosom verweilen und dort Zytokine induzieren (Honda, Ohba et al. 2005). Diesen Effekt scheint Lipofectamine2000 hier nicht zu haben. Ergänzend hat sich gezeigt, dass ein komplexes Zusammenspiel aus CpG-Typ und dessen Struktur (als Monomer oder in Micropartikeln) und das pH-abhängige Transfektionsreagenz einen Einfluß darauf haben, ob eine Zytokinproduktion stattfindet oder nicht (Guiducci, Ott et al. 2006). Da TLR9 und TLR7 verwandt sind, sind ähnlich wichtige Faktoren auch gut für das Signaling von TLR7 denkbar.

Eine weitere theoretische Erklärung, warum unter Verwendung bestimmter Reagenzien keine Immunstimulation erfolgt, ist eine überhaupt nicht stattfindende Endozytose der Stimulantien in die Zelle. Dieses Hindernis konnte von uns in unseren Untersuchungen mittels FACS-Analysen und den mikroskopischen Aufnahmen ausgeschlossen werden. Am Beispiel von Lipofectamine2000 oder auch Gene Porter zeigt sich, dass durchaus eine Aufnahme der fluoreszenzmarkierten RNA vorhanden ist (nicht alle Daten gezeigt).

Im Optimalfall wäre wünschenswert, Ergebnisse aus Experimenten in Mauszellen auf humane Zellen zu übertragen, um direkte Rückschlüsse auf Mechanismen im menschlichen Körper ziehen zu können. In den durchgeführten Stimulationen zeigten sich allerdings große *Abweichungen zwischen murinem und humanem System* bei Stimulation von TLR7.

Betrachtet man die von uns vorgenommene Gruppeneinteilung der Reagenzien nach ihrer Funktionalität in Tabelle 1 (Ergebnisse), so ist dieses Phänomen auf den ersten Blick ersichtlich: Nur DOTAP und Lipofectamine haben sich bei der Transfektion von humanen und murinen Zellen bewährt. Alle anderen Reagenzien zeigten in beiden Systemen keine konstante Immunstimulation.

In den von uns durchgeführten Stimulationen fiel eine große Unbeständigkeit im humanen System auf. Selbst bei Transfektionen mit RNA40 und DOTAP war die Zytokinproduktion sehr variabel: So war es durchaus möglich, dass keine oder gar eine verhältnismäßig überschießende Immunreaktion erfolgte. „Überschießend“ meint in diesem Kontext, dass selbst nicht stimulierte Zellen wie beispielsweise die Leerkontrolle eine hohe Zytokinproduktion zeigten (Daten nicht abgebildet). Gegensätzlich hierzu erwies sich die Kombination aus RNA und DOTAP im murinen System stets als sicherer Induktor für die Bildung von IFN- α .

Auch andere Gruppen haben das komplexe Zusammenspiel von Zelltyp und Reagenz untersucht (Kiefer, Clement et al. 2004) und konnten zeigen, dass die Optimierung der Transfektion von vielen Faktoren abhängt, wie zum Beispiel dem Unterschied zwischen murinen und humanen Zellen.

Ursache für das auffällig variable Verhalten in menschlichen Zellen können individuelle Eigenschaften der Spender sein, aus deren Blut die PBMC gewonnen wurden. So kann bei einem Spender, in dessen Körper eine versteckte Infektion vorliegt, die Produktion von IFN- α durch die Leukozyten schon unabhängig von der Stimulation erhöht sein. Dies könnte die oben erwähnte überschiessende IFN- α Produktion gut erklären, da die Zellen schon zuvor einer Stimulation *in vitro* unterzogen wurden.

Neben akuten Ereignissen im Spenderkörper wie einer viralen Infektion, können auch permanente Gegebenheiten bestehen, die einen Einfluss auf die Bildung von

Zytokinen wie IFN- α haben. Wichtig wäre hier, mögliche genetische Polymorphismen von TLR7 zu bedenken. Diese müssen sich nicht unbedingt auf den ersten Blick im Phänotyp des Einzelnen widerspiegeln, können jedoch auf zellulärer und molekularer Ebene zu signifikanten Unterschieden zwischen Individuen führen. Im Bezug auf die von uns untersuchte Interaktion von TLR7 und RNA40 könnten geringe Abweichungen in der Genetik dazu führen, dass die Affinität zwischen Rezeptor und Ligand abnimmt. Eine kürzlich veröffentlichte Studie deutet in ähnliche Richtung: Ein so genannter single nucleotide polymorphism (SNP) in der Sequenz von TLR7 führt dazu, dass entzündliche Reaktionen und Leberfibrose bei Patienten mit chronischer Hepatitis C Infektion schwächer ausgeprägt sind (Schott, Witt et al. 2007).

Der therapeutische Einsatz von Liposomen wird auch im Bezug auf die Stimulation von TLRs mit ihren entsprechenden Agonisten viel diskutiert (Dow 2008). Um Sicherheit gewährleisten zu können, ist es folglich nicht ausreichend, nur die Funktionsweise des eigentlichen Stimulus oder Inhibitors zu verstehen, sondern auch die der eingesetzten Hilfsstoffe, in diesem Fall die Liposomen. Diese sollten ganz besondere Eigenschaften, wie Endozytose der Lipoplexe (Almofti, Harashima et al. 2003) und intrazellulären Schutz der Liganden vor Abbau haben (Bochot, Couvreur et al. 2000). Die Interaktion von Rezeptor und seinem Ligand sollte jedoch nicht beeinflusst werden.

Umso erstaunlicher und unerwarteter war die Entdeckung, die wir im Lauf der Stimulationen wiederholt machten: die *Fähigkeit einiger Transfektionsreagenzien, auch ohne Zugabe von RNA40 eine IFN- α Antwort zu induzieren*. Die RNA40 selbst hingegen war ohne Vorinkubation nicht in der Lage, die Zytokinproduktion zu fördern. Beurteilt man die Reagenzien nach ihrer Funktion als Hilfsstoffe, so darf diese Eigenschaft nicht auftreten, da sie das Ergebnis einer Stimulation grob verfälscht.

Um diesen Mechanismus verstehen zu können, bedurfte es mehr Informationen über die genaue Zusammensetzung der Reagenzien. Dies ist nicht nur für den eigentlichen Einsatz des Reagenzes als Hilfsmittel für Transfektionen von Wichtigkeit, sondern auch, um generell mögliche chemische oder biologische Strukturen zu

identifizieren, die einen immunstimulatorischen Effekt besitzen. Hierbei muss es sich nicht zwangsläufig um einen Liganden für TLR7 handeln, es könnten auch andere Rezeptoren beteiligt sein, deren Stimulation zu einer IFN- α Produktion führt. Die Information, über welchen Rezeptor im vorliegenden Beispiel die Zytokinproduktion eingeleitet wird, könnte auch interessante Aussagen über die in dem Abschnitt über die intrazellulären Lokalisationsmuster diskutierten Wirkweisen der Transfektionsreagenzien machen. In unserem Fall würde man davon ausgehen, dass die RNA40 in das Endosom transportiert wird, um TLR7 zu stimulieren. Jedoch ist diese Annahme zum heutigen Zeitpunkt nicht sicher belegt.

Die Beobachtung, dass einige Reagenzien selbst einen stimulativen Effekt haben, wurde auch von anderen Gruppen veröffentlicht. So konnte in HeLa-Zellen mittels Lipofectamine2000 allein eine signifikante IL-8 Produktion induziert werden (Yoo, Hong et al. 2006). Diese Ergebnisse stützen unsere Aussagen bezüglich der Immunaktivierung durch Transfektionsreagenzien und verstärken die Fragen nach dem chemischen Aufbau dieser Stoffe.

In unseren mikroskopischen Untersuchungen zeigt sich im direkten Vergleich von DOTAP und Lipofectamine2000 eine scheinbar wesentlich höhere quantitative Aufnahme von Lipofectamine2000 als von DOTAP, da hier die Verteilung im gesamten zytoplasmatischen Raum stattfindet. Hier stellt sich nun erneut die Frage, warum keine adäquate Zytokinproduktion induziert wird. Dieses kann an den erwähnten RNA-Fragmenten liegen (Abschnitt über intrazelluläre Lokalisation) oder daran, dass an Lipofectamine2000 gebundene RNA40 das Zellinnere schneller erreicht, da Lipofectamine2000 die Endosomen zerstört und die RNA freisetzt.

Um zu überprüfen, ob Lipofectamine2000 zwar gut in Zellen aufgenommen wird, dann aber eine *zytotoxische Wirkung* auf diese hat, haben wir mittels PI das Überleben der Zellen nach der Transfektion beobachtet.

Wir führten einen direkten Vergleich zwischen DOTAP und Lipofectamine2000 durch, da diese beiden Produkte sich bisher in anderen Untersuchungen sehr konträr verhielten. Hier machten wir eine überraschende Entdeckung: mehr Zellen überleben

die Stimulation mit RNA40 unter Zuhilfenahme von Lipofectamine2000. Vergleicht man die Mengen der Zellen, die nach einer Stimulation mit Lipofectamine2000 oder DOTAP noch leben, ist der Outcome von Lipofectamine2000 in Bezug auf diesen Aspekt größer. Trotzdem aber ist die Immunstimulation mit DOTAP konstant höher. Auch andere Gruppen haben diese Effekte für DOTAP zeigen können (Boktov, Hirsch-Lerner et al. 2007) und ergänzend herausgefunden, dass die Kombination von DOTAP mit einem Helferlipid wie Cholesterol (im humanen System) oder DOPE (im murinen System) keinen protektiven Effekt hat.

Zusätzlich zu den Analysen unter Zuhilfenahme von PI konnten wir mit Aufnahmen am Durchlichtmikroskop ergänzend zeigen, dass eine reduzierte Zytokinproduktion von Lipofectamine2000 nicht am Absterben sämtliche Zellen bei der Stimulation liegen kann. Die Bilder demonstrieren vitale Zellen.

Was ist die Ursache für diese Beobachtung? Offensichtlich ist nicht die Menge der überlebenden Zellen wichtig. Auch wenn DOTAP zytotoxischer ist als sein Gegenspieler Lipofectamine2000, so ist doch die Verarbeitung der RNA40 effektiver. Hier schließt sich der Kreis. Geht man davon aus, dass DOTAP die RNA tatsächlich in das Endosom transportiert und Lipofectamine2000 eher unspezifisch in der Zelle lokalisiert ist, so kann die RNA40 durch die Hilfe von DOTAP natürlich effizienter das Immunsystem über Toll-like Rezeptor 7 stimulieren. Lipofectamine2000 bringt die RNA40 zwar auch in die Zelle, scheint aber nicht lange genug im endosomalen Kompartiment zu verweilen, als das eine Zytokininduktion stattfinden könnte.

Eine Erklärung für die im Abschnitt über die intrazellulären Lokalisationen zitierten Ergebnisse der Gruppe von Hornung kann also sein, dass Lipofectamine2000 die 5'triphosphat RNA effektiver zu ihrem Rezeptor transportiert als die RNA40. Die Zielstruktur von Lipofectamine2000 wäre demnach eher im Zytoplasma zu suchen.

Durch die große Unbeständigkeit in den Versuchsergebnissen und die schwere Vereinbarkeit von humanem und murinem System ergibt sich die Frage nach *Alternativen zu den bisher untersuchten synthetischen Transfektionsreagenzien*, haben sie doch prinzipiell viele Eigenschaften, die sie für den experimentellen und pharmakologischen Gebrauch sehr interessant machen. Doch gibt es andere Substanzen, die möglicherweise eine effektivere Transfektion garantieren?

Seit einiger Zeit gibt es experimentelle Bestrebungen, biologische Stoffe als Transfektionsreagenz einzusetzen. Es gibt Untersuchungen, mittels des natürlichen Polysaccharids Schizophyllan (SPG) CpG-DNA in TLR9-exprimierende Zellen zu transfizieren (Shimada, Coban et al. 2007). Die Ergebnisse der Zytokinauswertungen nach Stimulation mit unterschiedlichen Liganden scheinen viel versprechend zu sein. Leider wurde jedoch kein direkter Vergleich mit einem bisher eingesetzten Reagenz, zum Beispiel DOTAP, gezeigt, sodass die Beurteilung diesbezüglich schwer fällt.

Ein ebenfalls neuer Ansatz in diesem Bereich ist die Arbeit mit LL37. Hierbei handelt es sich um ein endogenes antimikrobielles Peptid, das eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Psoriasis zu spielen scheint (Lande, Gregorio et al. 2007). Eigentlich nicht-stimulatorische endogene DNA bildet Komplexe mit LL37 und wird so in das endosomale Kompartiment transportiert. Hier wird über TLR9 eine IFN- α Antwort induziert und es entsteht so das Bild einer autoimmunen Reaktion. Es ist denkbar, dass LL37 eventuell auch als Transporter für TLR7 dienen könnte, denn der Rezeptor gehört der gleichen TLR-Familie an wie TLR9.

Auch wurde kürzlich ein neues Transfektionsreagenz für siRNA publiziert:

Der multifunktionale Carrier 1,4,7-triazanonylimino-bis[N-(oleicyl-cysteinyl-histiny)-1-aminoethyl]propionamide] (THCO), der stabile Komplexe mit der siRNA bildet und diese schließlich pH-abhängig in das gewünschte Kompartiment entlässt (Wang, Nguyen et al. 2008). Im Vergleich zu bisherigen Reagenzien scheint die Transfektion von siRNA durch THCO optimiert worden zu sein-mikroskopische Aufnahmen zeigen ein offenbar wirkungsvolles Silencing durch die siRNA. Wie Versuche anderer Gruppen *in vivo* demonstrieren, war die antitumorale Wirkung von siRNA in Kombination mit synthetischen Stoffen wie DOTAP hinsichtlich Tumorlokalisierung, Gewebeverteilung und Zirkulation zunächst enttäuschend (de Wolf, Snel et al. 2007). Die drei oben genannten Beispiele zeigen, dass in vielen Bereichen Transfektionsbedingungen scheinbar erfolgreich verbessert wurden, um die Wirkung von Liganden an ihren Zielstrukturen zu verbessern.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der Untersuchungen war es, TLR7 mit Hilfe des synthetischen Liganden RNA40 unter Zuhilfenahme unterschiedlicher Transfektionsreagenzien näher zu beschreiben.

Wie wir in unseren Versuchen wiederholt zeigen konnten, ist die Effektivität der Transfektionsreagenzien oft sehr unbeständig. So ist die Übertragbarkeit von Ergebnissen vom murinen System auf das humane System kaum möglich. Auch innerhalb eines Zelltyps sind die immunstimulatorischen Eigenschaften der RNA40 vom eingesetzten Reagenz abhängig. Eine prinzipiell sehr schwierige Frage ergibt sich aus der Fähigkeit einiger Reagenzien, die Zytokinproduktion auch ohne den eigentlichen Stimulus zu induzieren, da hier grobe Verfälschungen der Ergebnisse auftreten können. Die Zytotoxizität der einzelnen Reagenzien wiederum hat keinen Einfluss auf die Effektivität, das hat der direkte Vergleich von DOTAP und Lipofectamine2000 ergeben.

Als Konsequenz hieraus ergibt sich die notwendige Standardisierung für die unterschiedlichen Transfektionsanforderungen, da sich unter anderem bisher auch der Weg von der experimentellen Forschung zum klinischen Einsatz noch sehr schwierig gestaltet. So hat sich in unseren Untersuchungen sowohl im humanen als auch im murinen System die Stimulation mit RNA40 am effektivsten durch DOTAP durchführen lassen.

Die erfolgreiche Erprobung völlig neuer Transfektionsreagenzien sind für Liganden von TLR7 bisher nicht durchgeführt worden, könnten jedoch interessant sein.

Neue Perspektiven ergeben sich aus der Möglichkeit, die RNA mit biologischen Substanzen zu transfizieren. Im Bereich der Transfektion von TLR9 mit DNA gibt es diesbezüglich schon einige neue Ansätze. Es ist bisher nicht bekannt, ob man in diesem Fall die Bedingungen auf TLR7 übertragen könnte oder ähnliche Schwierigkeiten wie im Vergleich der synthetischen Reagenzien auftreten. Prinzipiell spräche die gemeinsame Lokalisation beider Rezeptoren im Endosom für eine mögliche Übertragbarkeit der Transfektionsreagenzien von TLR9/DNA auf TLR7/RNA. Es hat sich bisher jedoch gezeigt, dass bewährte Methoden für die Transfektion von DNA nicht ohne genaue Prüfung auf RNA übertragen werden können.

Die Ergebnisse geben viele Ideen für weitere Forschungsziele und lassen sich gut mit der Aussage eines belgischen Forschers vereinbaren, wonach ein Transfektionsreagenz „intelligent“ sein muss, um intra- und extrazelluläre Barrieren zu überwinden und die Nukleotide am richtigen Zielort freizusetzen (Remaut, Lucas et al. 2006). Dieses gilt auch im Bezug auf TLR7 und die Stimulation mit seinen Liganden wie der RNA40.

Zur Optimierung von Versuchsabläufen und einer Vergleichbarkeit der Ergebnisse muss eine individuelle Zusammenstellung von Rezeptor, Ligand und Transfektionsreagenz erfolgen – je spezifischer, desto besser.

Im Bezug auf TLR7 und dessen Stimulation mittels des synthetischen Liganden RNA40 scheint bisher die Transfektion mit DOTAP die aussagekräftigsten Ergebnisse sowohl im humanen als auch im murinen System zu liefern.

6 Literaturverzeichnis

Ahmad-Nejad, P., H. Hacker, et al. (2002). "Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments." Eur J Immunol **32**(7): 1958-68.

Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **4**(7): 499-511.

Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.

Almofti, M. R., H. Harashima, et al. (2003). "Cationic liposome-mediated gene delivery: biophysical study and mechanism of internalization." Arch Biochem Biophys **410**(2): 246-53.

Audouy, S. and D. Hoekstra (2001). "Cationic lipid-mediated transfection in vitro and in vivo (review)." Mol Membr Biol **18**(2): 129-43.

Balmelli, C., M. P. Alves, et al. (2008). "Responsiveness of fibrocytes to toll-like receptor danger signals." Immunobiology **212**(9-10): 693-9.

Barrat, F. J., T. Meeker, et al. (2007). "Treatment of lupus-prone mice with a dual inhibitor of TLR7 and TLR9 leads to reduction of autoantibody production and amelioration of disease symptoms." Eur J Immunol **37**(12): 3582-6.

Beutler, B., Z. Jiang, et al. (2006). "Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large." Annu Rev Immunol **24**: 353-89.

Bochot, A., P. Couvreur, et al. (2000). "Intravitreal administration of antisense oligonucleotides: potential of liposomal delivery." Prog Retin Eye Res **19**(2): 131-47.

Boktov, J., D. Hirsch-Lerner, et al. (2007). "Characterization of the interplay between the main factors contributing to lipoplex-mediated transfection in cell cultures." J Gene Med **9**(10): 884-93.

Cao, Z., J. Xiong, et al. (1996). "TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1." Nature **383**(6599): 443-6.

Capecchi, M. R. (1980). "High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells." Cell **22**(2 Pt 2): 479-88.

Chow, J. C., D. W. Young, et al. (1999). "Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction." J Biol Chem **274**(16): 10689-92.

Chu, G., H. Hayakawa, et al. (1987). "Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA." Nucleic Acids Res **15**(3): 1311-26.

de Wolf, H. K., C. J. Snel, et al. (2007). "Effect of cationic carriers on the pharmacokinetics and tumor localization of nucleic acids after intravenous administration." Int J Pharm **331**(2): 167-75.

Deane, J. A., P. Pisitkun, et al. (2007). "Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation." Immunity **27**(5): 801-10.

Diebold, S. S., T. Kaisho, et al. (2004). "Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA." Science **303**(5663): 1529-31.

Dow, S. (2008). "Liposome-nucleic acid immunotherapeutics." Expert Opin Drug Deliv **5**(1): 11-24.

Du, X., A. Poltorak, et al. (2000). "Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution." Eur Cytokine Netw **11**(3): 362-71.

Farhood, H., R. Bottega, et al. (1992). "Effect of cationic cholesterol derivatives on gene transfer and protein kinase C activity." Biochim Biophys Acta **1111**(2): 239-46.

Felgner, J. H., R. Kumar, et al. (1994). "Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations." J Biol Chem **269**(4): 2550-61.

Felgner, P. L., T. R. Gadek, et al. (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7413-7.

Fitzgerald, K. A., E. M. Palsson-McDermott, et al. (2001). "Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction." Nature **413**(6851): 78-83.

Gao, X. and L. Huang (1995). "Cationic liposome-mediated gene transfer." Gene Ther **2**(10): 710-22.

Graham, F. L. and A. J. van der Eb (1973). "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA." Virology **52**(2): 456-67.

Guiducci, C., G. Ott, et al. (2006). "Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation." J Exp Med **203**(8): 1999-2008.

Haensler, J. and F. C. Szoka, Jr. (1993). "Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture." Bioconjug Chem **4**(5): 372-9.

Hasan, U., C. Chaffois, et al. (2005). "Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88." J Immunol **174**(5): 2942-50.

Hashimoto, C., K. L. Hudson, et al. (1988). "The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein." Cell **52**(2): 269-79.

Hayashi, F., K. D. Smith, et al. (2001). "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." Nature **410**(6832): 1099-103.

Heil, F., H. Hemmi, et al. (2004). "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." Science **303**(5663): 1526-9.

Hemmi, H., T. Kaisho, et al. (2002). "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway." Nat Immunol **3**(2): 196-200.

Honda, K., Y. Ohba, et al. (2005). "Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction." Nature **434**(7036): 1035-40.

Horng, T., G. M. Barton, et al. (2001). "TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway." Nat Immunol **2**(9): 835-41.

Hornung, V., W. Barchet, et al. (2008). "RNA Recognition via TLR7 and TLR8." Handb Exp Pharmacol(183): 71-86.

Hornung, V., J. Ellegast, et al. (2006). "5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I." Science **314**(5801): 994-7.

Ishii, K. J. and S. Akira (2005). "TLR ignores methylated RNA?" Immunity **23**(2): 111-3.

Ishii, K. J., C. Coban, et al. (2005). "Manifold mechanisms of toll-like receptor-ligand recognition." J Clin Immunol **25**(6): 511-21.

Ito, A., R. Miyazoe, et al. (1990). "Synthetic cationic amphiphiles for liposome-mediated DNA transfection." Biochem Int **22**(2): 235-41.

Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." Nat Immunol **5**(10): 987-95.

Kariko, K., M. Buckstein, et al. (2005). "Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA." Immunity **23**(2): 165-75.

Kawai, T., O. Adachi, et al. (1999). "Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin." Immunity **11**(1): 115-22.

Kawai, T. and S. Akira (2005). "Pathogen recognition with Toll-like receptors." Curr Opin Immunol **17**(4): 338-44.

Kawai, T. and S. Akira (2006). "Innate immune recognition of viral infection." Nat Immunol **7**(2): 131-7.

Kawai, T., O. Takeuchi, et al. (2001). "Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes." J Immunol **167**(10): 5887-94.

Kiefer, K., J. Clement, et al. (2004). "Transfection efficiency and cytotoxicity of nonviral gene transfer reagents in human smooth muscle and endothelial cells." Pharm Res **21**(6): 1009-17.

Koyama, S., K. J. Ishii, et al. (2007). "Differential role of TLR- and RLR-signaling in the immune responses to influenza A virus infection and vaccination." J Immunol **179**(7): 4711-20.

Krieg, A. M. (2007). "The toll of too much TLR7." Immunity **27**(5): 695-7.

Ku, C. L., H. von Bernuth, et al. (2007). "Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity." J Exp Med **204**(10): 2407-22.

Lande, R., J. Gregorio, et al. (2007). "Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide." Nature **449**(7162): 564-9.

Lee, R. J. and L. Huang (1996). "Folate-targeted, anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer." J Biol Chem **271**(14): 8481-7.

Lemaitre, B., E. Nicolas, et al. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." Cell **86**(6): 973-83.

Lorusso, V., L. Manzione, et al. (2007). "Role of liposomal anthracyclines in breast cancer." Ann Oncol **18 Suppl 6**: vi70-3.

Maruyama-Tabata, H., Y. Harada, et al. (2000). "Effective suicide gene therapy in vivo by EBV-based plasmid vector coupled with polyamidoamine dendrimer." Gene Ther **7**(1): 53-60.

Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1997). "Innate immunity: impact on the adaptive immune response." Curr Opin Immunol **9**(1): 4-9.

Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, et al. (1997). "A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature **388**(6640): 394-7.

O'Connor, L., D. C. Huang, et al. (2000). "Apoptosis and cell division." Curr Opin Cell Biol **12**(2): 257-63.

Oshiumi, H., M. Matsumoto, et al. (2003). "TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction." Nat Immunol **4**(2): 161-7.

Remaut, K., B. Lucas, et al. (2006). "Delivery of phosphodiester oligonucleotides: can DOTAP/DOPE liposomes do the trick?" Biochemistry **45**(6): 1755-64.

Richwald, G. A. (1999). "Imiquimod." Drugs Today (Barc) **35**(7): 497-511.

Schlaepfer, E., A. Audige, et al. (2006). "TLR7/8 triggering exerts opposing effects in acute versus latent HIV infection." J Immunol **176**(5): 2888-95.

Schott, E., H. Witt, et al. (2008). "Association of TLR7 single nucleotide polymorphisms with chronic HCV-infection and response to interferon-a-based therapy." J Viral Hepat **15**(1): 71-8.

Schott, E., H. Witt, et al. (2007). "A Toll-like receptor 7 single nucleotide polymorphism protects from advanced inflammation and fibrosis in male patients with chronic HCV-infection." J Hepatol.

Sen, G. C. and S. N. Sarkar (2005). "Transcriptional signaling by double-stranded RNA: role of TLR3." Cytokine Growth Factor Rev **16**(1): 1-14.

Shimada, N., C. Coban, et al. (2007). "A polysaccharide carrier to effectively deliver native phosphodiester CpG DNA to antigen-presenting cells." Bioconjug Chem **18**(4): 1280-6.

Takeda, K., T. Kaisho, et al. (2003). "Toll-like receptors." Annu Rev Immunol **21**: 335-76.

Tang, M. X., C. T. Redemann, et al. (1996). "In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers." Bioconjug Chem **7**(6): 703-14.

Vollmer, J., S. Tluk, et al. (2005). "Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8." J Exp Med **202**(11): 1575-85.

Wang, C., L. Deng, et al. (2001). "TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK." Nature **412**(6844): 346-51.

Wang, X. L., T. Nguyen, et al. (2008). "A multifunctional and reversibly polymerizable carrier for efficient siRNA delivery." Biomaterials **29**(1): 15-22.

Yamamoto, M., S. Sato, et al. (2002). "Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling." J Immunol **169**(12): 6668-72.

Yoo, J. W., S. W. Hong, et al. (2006). "Inflammatory cytokine induction by siRNAs is cell type- and transfection reagent-specific." Biochem Biophys Res Commun **347**(4): 1053-8.

7 Danksagung

Für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit möchte ich mich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. Stefan Bauer, der mich in sein Institut aufgenommen und es mir ermöglicht hat, in angenehmer, kollegialer Atmosphäre diese Arbeit zu erstellen.

Herrn Dr. Philipp Yu für seine außerordentlich intensive, menschliche Betreuung und immerwährende Hilfsbereitschaft. Durch seine kompetente Unterstützung habe ich sehr viele Kenntnisse im Bereich des wissenschaftlichen und methodischen Arbeitens im Labor erlangen können.

Frau Dr. Marianne Nain für die vielen interessanten Gespräche, die sowohl meinen fachlichen als auch meinen kulturellen Horizont sehr erweitert haben.

Herrn Dr. Andreas Kaufmann für die sehr geduldige Hilfestellung besonders in allen technischen Belangen.

Frau Elfriede Klein, Frau Gundi Ehm, Frau Stephanie Beil, Frau Petra Sandrock und Frau Marion Kaufmann für die freundliche Unterstützung bei allen Fragen des Laboralltags.

Franca Symalla, Andreas Schlitzer, Jutta Andres und Tina von Thülen, mit denen ich viele schöne Stunden verbracht habe.

8 Anhang

8.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren

Bauer, Stefan (Prof. Dr.)
Kaufmann, Andreas (Dr.)
Nain, Marianne (Dr.)
Yu, Philipp (Dr.)